

Y.S.CHANG & ASSOCIATES

K.P.O.BOX 136, SEOUL 110, KOREA

Member : AIPPI / JPAALLES
Fax : (82-2) 568-5377 / 5969
Phone : 556-8224-8 568-0461
Telex : 24928 (YSCHANG)

FILE COPY

提出書類写本

Kind of Protection : PATENT

Applicant : NOVO NORDISK A/S

Title : A Method of Preparing a Variant of
a Lipolytic Enzyme

Encl	Document filed	Filing Date	Kor. Appln. No.
X	Application 出願書	August 22, 1996	96-704602
	Petition for Exam 出願審査請求書		
X	Power of Attorney 委任状	September 3, 1996	"
	Priority Document 優先権主張書類		
	Argument 意見書		
	Amendment 補正書		
	Printed Matter 審査参考資料		
	Appeal 抗告審判請求書		
Your Ref.No.		4153.204-KR, LiAS/KHgh	
Our Ref.No.		DK-6P-0825	

張龍植特許法律事務所
韓国 Seoul 光化門郵遞局私書函136号

TRANSLATION

Please be advised that the following Application Number has been assigned to this case by the Korean Industrial Property Office as below :

NOTICE OF APPLICATION NUMBER

(PCT)

TO : Y.S.Chang, Attorney
Appln. Date : February 22, 1995
Applicant : Novo Nordisk A/S

Date: September 12, 1996
Appln. No.: KPA No. 96-704602
Request for Exam.: (yes, no)
Request for Earlier Laying Open : (yes, no)
Commissioner
Korean Industrial Property Office

Filing Date of : August 22, 1996
the Translation

Remarks

1. (Order of Examinations) Patent or Utility Model applications shall be examined in the order of the date Requesting Examination with the examination initiated only by formal Request. Design or trademark applications are automatically examined according to the filing dates.
2. (Request for Examination) The application shall be deemed withdrawn if the formal Request (Form No. 24 of the Patent Law Regulations) is not filed within 5 years of the Korean filing date for patents and 3 years for utility models.

Case	Official Fees for Requests for Examination
Patent Application	Basic fee : US\$96.00, Additional fee for each claim in excess of one(1) : US\$ 22.00
Utility Model Application	Basic fee : US\$45.00, Additional fee for each claim in excess of one(1) : US\$ 12.00

3. (Recordal of Changes) When the address or name of the applicant is changed, a request for recording the change (Form No. 4 of the Patent Law Regulations) must be immediately filed with the Korean Industrial Property Office.
4. (Payment of Official Fees) Payment of application or registration fees, etc. shall be made at any Korean National Treasury Bank in the official form required by then Korean Industrial Property Office ; one of the receipts issued by the bank should be attached to the relevant documents. Alternatively, a Postal Money Order in the required amount may replace the bank payment and receipt.
5. (Reference) For questions, please contact the Inquiry Department (Tel. 568-8150/64) or Application Department (Tel. 568-6079) of the Korean Industrial Property Office.
6. (Address of the Korean Industrial Property Office) 823-1 Yeoksam-dong, Kangnam-ku, Seoul, 135-784, Korea.

Official Filing
Certificate

관인생략

출원번호통지서

(PCT)



받는 사람
(대리인) 장용식

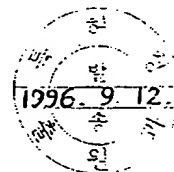
1 3 5 0 3 0

주 소 서울시 강남구 역삼동 824-20(상경빌딩)

출원일자 1995. 02. 22. 심사청구(무) 공개신청(무)
출원번호 1996년 특허출원 제 704602 호

출원인 : 노보 노르디스크 아크티에 셀스카브

특 허 청 장



TRANSLATION

PAPER PURSUANT TO ARTICLES 201 and 203 OF THE KOREAN PATENT LAW			
Applicant	Novo Nordisk A/S Novo Allé DK-2880 Bagsværd Denmark		
Attorney	Y. S. Chang J. S. Jeong	Code of Attorney	K020 K184
Inventor(s)	Allan Svendsen Ib Groth Clausen Jens Sigurd Okkels Marianne Thellersen c/o Novo Nordisk A/S Novo Allé, DK-2880 Bagsværd Denmark		
Title of Invention	A Method of Preparing a Variant of a Lipolytic Enzyme		
International Appln. Number	PCT/DK95/00079	International Filing Date	Feb. 22, 1995

NZAS-0018668

TRANSLATION

Priority Claim pursuant to Art. 54 of the Patent Law	Country	Kind of Appln.	Filing Date	Appln. No.	Certified Document	
					attached	not attached
	Denmark	Patent	Feb. 22, 1994	0217/94		O

We are filing this Application pursuant to Articles 201 and 203 of the Patent Law.

August 22, 1996

Y. S. Chang
Patent Attorney
J. S. Jeong
Patent Attorney

To : Commissioner
Korean Industrial Property Office

Attached Documents :

1. Paper and Translations of Specification, Claims, Abstract and Drawings Each 3 copies
2. Power of Attorney with its Translation (will be filed)
3. Translation of Priority Document (will be filed)
4. Translation of Amendment Original, Duplicate Each 1 copy

Official Filing Charges	Application	basic fee	20 pages	₩ 20,000
		additional fee	58 pages	₩ 40,600
	Priority Claiming fee		Priority Application : 1 case	₩ 18,000
	Request for Examination fee		claim	
	Total		₩ 78,600	

특허법 제201조 및 제203조의 규정에 의한 서면

접수 인관			방 식 심사관	출원번호			
				당	당	심 사 관	
출원인	성 명	노보 노르디스크 아크티에 셀스카브(NOVO NORDISK A/S)					
	주 소	대표자 안네 제케르					
	국 적	덴마크		출원인코드			
대리인	성 명	변리사 장 용 식, 정 진 상		대리인코드		K020, K184	
	주 소	서울특별시 강남구 역삼동 824-20		전 화 번 호		556-8224-6	
발명자	성 명	알란 스펀트젠		국 적		덴마크	
	주 소	덴마크 디케이-2880 박스베르트 노보 알레 노보 노르디스크 아크티에 셀스카브내					
	성 명	입 그로트 클라우젠		국 적		덴마크	
	주 소	덴마크 디케이-2880 박스베르트 노보 알레 노보 노르디스크 아크티에 셀스카브내					
	성 명	엔스 지그르트 오켈스		국 적		덴마크	
	주 소	덴마크 디케이-2880 박스베르트 노보 알레 노보 노르디스크 아크티에 셀스카브내					
	성 명	마리안 텔러젠		국 적		덴마크	
	주 소	덴마크 디케이-2880 박스베르트 노보 알레 노보 노르디스크 아크티에 셀스카브내					
발명의 명칭		지질분해효소의 변이체 제조방법 (A METHOD OF PREPARING A VARIANT OF A LIPOLYTIC ENZYME)					
국제출원번호		PCT/DK95/00079		국제출원일		1995. 2. 22.	
특허법(제54조 또는제55조)의 규정에 의한 우선권주장	출 원 국 명	출 원 종 류	출 원 일 자	출 원 번 호	증명서류 첨부 미첨부		
	덴마크	특 허	1994. 2.22.	0217/94	O		
<p>특허법 제201조 및 동법 제203조의 규정에 의하여 위와 같이 제출합니다.</p> <p>1996년 8월 22일</p> <p>대리인 변리사 장 용 식</p> <p>대리인 변리사 정 진 상</p> <p>특허청장 귀하</p>							
첨부서류 :			수 수 료				
1. 서면, 명세서번역문, 특허청구의 범위번역문, 요약서번역문 및 도면번역문 각 3통 2. 위임장 및 동번역문(추후제출) 3. 우선권서류번역문(추후제출) 4. 보정서 번역문 제출서 정부 각 1통			출원료	기 본	20면	20,000원	
				가 산	58면	40,600원	
			우선권주장료		1건	18,000원	
			심사청구료				
			합 계		78,600원		

張龍植特許法律事務所

TEL 556-8224-6

NZAS-0018670

지정국 (지역 또는 국가) 현황

지역특허

☒ EP 유럽특허 : AT 오스트리아, BE 벨지움, CH and LI 스위스, 리히텐슈타인, DE 독일, DK 덴마크, ES 스페인, FR 프랑스, GR 그리스, GB 영국, IE 아일랜드, IT 이태리, LU 룩셈부르크, MC 모나코, NL 네덜란드, PT 포르투갈, SE 스웨덴
그외 유럽특허조약 및 PCT 제약국

☒ OA OAPI 특허 : 베냉 Benin, 브르키나파소 Burkina Faso, 카메룬 Cameroon, 중앙아프리카 공화국, Central African Republic, 차드 Chad, 콩고 Congo, 가봉 Gabon, 말리 Mali, 모리타니아 Mauritania, 니제르 Niger, 세네갈 Senegal, 토고 Togo, 그외 OAPI 회원국이며 PCT 제약국(다른 종류의 보호나 취급을 원할 경우에는 점선위에 기재하십시오.) CI 코트디부아르, GN 기니아.....

☒ AP ARIPO 특허: KE 케냐, MW 말라위, SD 수단, SZ 스와질랜드, UG 우간다.
그외 ARIPO 특허조약 및 협약국

국내특허(다른 종류의 보호나 취급을 원할 경우에는 점선위에 기재하십시오.)

☒ AT 오스트리아 Austria.....
☒ AU 호주 Australia
☒ BB 바베이도스 Barbados
☒ BG 불가리아 Bulgaria
☒ BR 브라질 Brazil.....
☒ BY 벨라루스 Belarus
☒ CA 캐나다 Canada
☒ CH and LI 스위스, 리히텐슈타인
Switzerland, Liechtenstein.....
☒ CZ 체코 Czech Republic.....
☒ DE 독일 Germany
☒ DK 덴마크 Denmark
☒ ES 스페인 Spain
☒ FI 핀란드 Finland
☒ GB 영국 United Kingdom
☒ HU 헝가리 Hungary
☒ JP 일본 Japan
☒ KP 북한 Democratic People's
Republic of Korea
☒ KR 대한민국 Republic of Korea
☒ KZ 카자흐스탄 Kazakhstan.....
☒ LK 스리랑카 Sri Lanka
☒ LU 룩셈부르크 Luxembourg
☒ MC 마다가스카르 Madagascar.....
☒ MN 몽고 Mongolia
☒ MW 말라위 Malawi
☒ NL 네덜란드 Netherlands
☒ NO 노르웨이 Norway
☒ NZ 뉴질랜드 New Zealand
☒ PL 폴란드 Poland
☒ PT 포르투갈 Portugal
☒ RO 루마니아 Romania

☒ RU 러시아연방 Russian Federation
☒ SD 수단 Sudan
☒ SE 스웨덴 Sweden
☒ SK 슬로바키아 Slovakia
☒ UA 우크라이나 Ukraine
☒ US 미국 United States of America.....
☒ VN 베트남 Viet Nam.....

이 서식 발행이후 국내특허를 목적으로 PCT 제약국이된 국가를 지정하는 경우에는 다음에 기재하십시오.

☒ AM 아르메니아 Armenia.....
☐ CL 칠레 Chile.....
☒ CN 중국 China.....
☒ EE 에스토니아 Estonia.....
☒ GE 그루지아 Georgia.....
☒ KE 케냐 Kenya.....
☒ KG 카이자스탄 Kyrgyzstan
☒ LR 리베리아 Liberia.....
☒ LT 리투니아 Lithuania.....
☒ LV 라트비아 Latvia
☒ MD 몰도바 공화국 Republic Moldova
☒ MX 멕시코 Mexico
☐ SG 싱가포르 Singapore.....
☒ SI 슬로베니아 Slovenia
☒ TJ 타지키스탄 Tajikistan
☒ TT 트리니다드 토바고
Trinidad and Tobago
☒ UZ 우즈베키스탄 Uzbekistan
☒ UG 우간다 Uganda

명 세 서

지질분해효소의 변이체 제조방법

도면의 간단한 설명

제 1도는 pYESHL의 제한 지도이고,

제 2도는 플라스미드 pA01의 제한 지도이고,

제 3도는 플라스미드 pAHL의 제한 지도이고, 및

제 4도 및 5도는 본 발명의 변이체를 암호화하는 유전자의 구조물이다.

발명의 상세한 설명

발명의 분야

본 발명은 모(母) 지질분해효소의 변이체 제조방법 및 그 방법에 의해 제조된 변이체에 관한 것이다. 더구나, 본 발명은 본 발명의 변이체를 암호화하는 DNA 구조물, DNA 구조물로 이루어지는 발현 벡터와 숙주세포 및 변이체로 이루어지는 세제 첨가물 또는 세제 조성물에 관한 것이다.

발명의 배경

다년간 지질분해효소는 세제효소, 즉 의복 및 다른 직물로부터 지질 또는 지방 얼룩을 제거하기 위한 것으로 사용되어 왔다.

예를 들어서, 다양한 미생물 리파제가 세제효소로 제안되어 왔다.

그러한 리파제의 예로는 EP 258 068과 EP 305 216에 기술된 *Humicola lanuginosa*

리파제, EP 238 023에 기술된 *Rhizomucor miehei* 리파제, EP 214 761에 기술된

C. antarctica 리파제 A 또는 B와 같은 *C. antarctica* 리파제 같은 *Candida* 리파제,

EP 218 272에 기술된 *P. alcaligenes* 및 *P. pseudoalcaligenes* 리파제, EP 331 376에 기술된 *P. cepacia* 리파제 같은 *Pseudomonas* 리파제, *B. subtilis* 리파제(Dartois et al., 1993), *B. stearothermophilus* 리파제(JP 64/744992) 및 *B. pumilus* 리파제(EP 91 00664) 같은 *Bacillus* 리파제를 포함한다.

더구나, 많이 클론화된 리파제는 야마구치(Yamaguchi, S. et al., 1991)에 의해 기술된 *Penicillium camembertii* 리파제, *Geotricum candidum* 리파제(Schimada, Y. et al., 1989), 그리고 *R. delemar* 리파제(Hass, M.J et al., 1991), *R. niveus* 리파제(Kugimiya, W. 1992) 및 *R. oryzae* 리파제와 같은 다양한 *Rhizopus* 리파제를 포함하는 많은 클론화된 리파제가 기술되어 왔다.

세계 효소로 제안되고 있는 지질분해효소의 다른 유형은 예를들면 WO 88/09367에 기술된 것과 같은 *Pseudomonas mendocina*로부터 유도된 쿠티나제, 또는 *Fusarium solani pisi*(WO 90/09446에 기술됨)로부터 유도된 쿠티나제를 포함한다.

근년에 세계 목적을 위해 개선된 성질을 갖는 리파제 변이체를 제조하기 위한 시도가 행해졌다. 예를 들어, WO 92/05249는 생형 리파제 효소의 일정한 특성이 그것들의 아미노산 서열의 특이적, 즉 부위-지정된 변형에 의해 변화된 개선된 성질을 갖는 리파제 변이체를 개시한다. 보다 구체적으로, 모 리파제의 소위 지질 접촉대의 하나 이상의 아미노산 잔기가 변형되어진 리파제 변이체가 기술되어 있다.

PCT/DK93/00225는 리파제의 중요한 위치를 차지하는 아미노산 잔기가 변형되어진 개선된 성질을 갖는 리파제 변이체를 기술한다.

EP 407 225는 구체적으로 정의된 아미노산 변형에 의해 제조되어진 단백질 분해 효소에 대해 개선된 내성을 갖는 리파제 변이체를 기술한다.

EP 260 105는 활성부위로부터 15Å 내의 아미노산 잔기가 치환된 가수분해 효소를 기술한다.

상기 언급한 리파제 변이체는 전부 모 리파제의 2차 또는 3차 구조에서 유형을 기초로 하거나 아니면 위치를 기초로 하여 선택된 특이적인 아미노산 잔기의 변형을 초래하는 부위-지정된 돌연변이유발을 사용하여 구성되었다.

주어진 단백질의 돌연변이체 또는 변이체를 구성하기 위한 대안적인 접근은 임의적 돌연변이유발을 기초로 하였다.

예를들어, US 4,898,331 및 WO 93/01285는 그러한 기술을 개시한다.

개선된 세척 및/또는 식기세척성질을 갖는 새로운 지질분해효소가 필요하며, 본 발명의 목적은 그러한 효소를 제조하는 것이다.

발명의 간단한 설명

이제 본 발명자는 모 효소와 비교하여 개선된 세척 및/또는 식기세척성능을 갖는 지질분해효소의 변이체의 새로운 제조방법을 개발하였다. 이 방법은 지질분해효소를 암호화하는 DNA 서열의 임의적 또는 국소화된 임의적 돌연변이유발을 기초로 한다.

보다 구체적으로, 본 발명의 첫번째 양상은 모 지질분해효소의 모 지질분해효소의 변이체를 제조하는 방법에 관한 것으로, 이 방법은

(a) 모 지질분해효소를 암호화하는 DNA 서열이 임의적 돌연변이유발을 일으키는 단계,

(b) 숙주 세포에서 단계 (a)에서 얻은 돌연변이된 DNA 서열을 발현시키는 단계, 그리고,

(c) 모 지질분해효소와 비교하여 칼슘에 대한 감소된 의존성 및/또는 세제 또는 하나 이상의 세제 성분들에 대해 개선된 내성을 갖는 돌연변이된 지질분해효소를 발현하는 숙주세포를 스크리닝하는 단계로 이루어진다.

본문에서, "지질분해효소"라는 용어는 트리글리세리드 또는 인지질을 분해하는 능력과

같은 지질분해능력을 나타내는 효소를 가리킴을 뜻한다. 지질분해효소는 예를들어, 리파제, 포스포리파제, 에스테라제 또는 쿠티나제가 될 수 있다.

"임의적 돌연변이유발"이란 용어는 종래의 방법에서 이해되는 것을 뜻한다.

즉, 모 효소의 임의적 위치에서 하나 이상의 돌연변이의 도입을 가리킴을 뜻한다(즉, 부위-특이적 돌연변이유발과는 반대됨).

전형적으로 임의적 돌연변이는 변형시킬 DNA 서열의 많은 사본을 돌연변이원에 노출시킨 다음에 변이체의 존재를 스크리닝함으로써 도입된다.

임의적 돌연변이를 도입하는 적당한 기술은 하기에서 자세히 논의된다.

단계 c)의 스크리닝 기준은 모 효소와 비교하여 개선된 세척 및/또는 식기세척성능을 갖는 모 지질분해효소의 변이체를 확인하는데 구체적으로 사용되는 것으로 생각된다.

본문에서, "칼슘에 대한 감소된 의존성"이란 용어는 돌연변이된 지질분해효소가 유사한 조건하에서 시험할 때 모 효소와 같은 활성도를 나타내기 위해 더 적은 양의 칼슘을 요구함을 뜻하고자 한다. 바람직하게는, 본 발명의 돌연변이된 지질분해효소는 효소활성을 나타내기 위해 칼슘의 존재에 실질적으로 무관하다.

"세제 또는 세제 성분에 대한 개선된 내성"이란 용어는 돌연변이된 지질분해효소가 모 지질분해효소보다 세제 또는 세제 성분의 더 높은 농도에서 활성임을 의미한다.

본문에서 "세제"라는 용어는 세탁 또는 식기세척에 보통 사용되는 세제성분들의 혼합물을 가리킴을 뜻한다. 유사하게, "세제 성분"은 세제 또는 식기세척 조성물에서 보통 발견되는 성분 또는 원료를 가리키며, 이들의 예는 다음의 설명에서 주어진다.

본 발명 방법에 의해 제조된 변이체는 칼슘에 대한 감소된 의존성 및/또는 세제 또는 하나 이상의 세제성분에 대해 개선된 내성을 추가로 하여 세척 및/또는 식기세척조건 하에서 시험될 때, 바람직하게는 모 지질분해효소의 활성에 상당하거나 능가하는 크기의 지질분해활성을 나타낸다는 것이 이해될 것이다.

본 발명의 방법의 단계 c)에서 정의된 스크리닝 기준은 이 기술분야에서 공지된 어떤 적당한 방법에 의해서도 결정될 수 있다. 본 발명의 목적을 위해 개발된 구체적인 적당한 분석법은 하기의 물질 및 방법 단원에서 기술된다.

본 발명의 다른 양상은 모 지질분해효소와 비교하여 칼슘에 대해 감소된 의존성 및/또는 세제 또는 세제성분에 대해 개선된 내성을 갖는 지질분해효소의 변이체를 암호화하는 돌연변이된 DNA 서열로 이루어지는 DNA 구조물에 관한 것이며, 이 DNA 서열은 본 발명의 방법의 단계 c)에서 선택된 숙주세포로부터 분리된다.

본 발명의 또다른 양상은 DNA 구조물을 수반하는 재조합 발현 벡터, DNA 구조물 또는 벡터로 형질전환되는 세포뿐만 아니라 변이체의 제조에 도움이 되는 조건하에서 상기 세포를 배양함으로써 모 지질분해효소의 변이체를 제조하고, 이 변이체를 배양물에서 회수하는 방법에 관한 것이다.

본 발명의 최종 양상은 지질분해효소의 변이체와, 구체적으로 세탁 또는 식기세척을 위한 세제 효소로서 상기 변이체의 사용, 그리고 변이체로 이루어지는 세제 첨가제 및 세제 조성물에 관한 것이다.

발명의 상세한 설명

모 지질분해효소를 암호화하는 DNA 서열의 클로닝

본 발명에 따라 임의적 돌연변이유발을 받게 되는 모 지질분해효소를 암호화하는 DNA 서열은 이 기술분야에서 공지된 방법의 사용으로 문제의 모효소를 생산하는 어떤 세포 또는 미생물로부터 분리될 수 있다.

예를 들어, DNA 서열은 서열을 품고 있는 것으로 예상되는 유기체로부터 cDNA 또는 게놈 라이브러리를 확립하고, 종래의 방법으로 양성의 클론을 스크리닝함으로써 분리될 수 있다. 그러한 방법의 예는 표준 기술(참고, Sambrook et al., 1989)에 따른 모효소

(서열정보가 유용한 경우) 또는 관련 지질분해효소(모효소에 관한 서열정보가 유용하지 않은 경우)의 아미노산 또는 DNA 서열을 기초로 하여 제조된 올리고뉴클레오티드 탐침과의 혼성화, 및/또는 리파제 활성 같은 지질분해활성을 발현하는 클론을 선택, 및/또는 모 지질분해효소에 대해 길러진 항체와 반응성인 단백질을 제조하는 클론을 선택하는 것이다.

cDNA 또는 게놈 라이브러리로부터 본 발명에 따라 변형시킬 모 지질분해효소를 암호화하는 DNA 서열을 분리하는 바람직한 방법은 모 효소의 DNA 또는 아미노산 서열을 기초로 하여 제조된 축퇴의 올리고뉴클레오티드 탐침을 사용하는 폴리머라제 연쇄반응(PCR)의 사용에 의한 것이다. 예를 들어, PCR은 US 특허 제 4,683,202호 또는 R.K. Saiki 등(et al., (1988))에 의해 기술된 기술을 사용하여 수행될 수 있다.

대안으로, 모효소를 암호화하는 DNA 서열은 확립된 표준 기술, 예를 들어 Beaucage 및 Caruthers에 의해 기술된 포스포아미디트 방법(1981), 또는 Matthes 등(et al., 1984)에 의해 기술된 방법에 의해 합성에 의해 제조될 수 있다.

포스포아미디트 방법에 따라서, 올리고뉴클레오티드는 예를 들어 자동 DNA 합성기에서 합성되고, 정제되고, 어니일링되고, 연결되어 적당한 벡터에서 클론화된다.

최종적으로, 모효소를 암호화하는 DNA 서열은 (적당한 대로) 합성, 게놈 또는 cDNA 기원의 단편, 표준기술에 따라서 모효소를 암호화하는 전체 DNA 서열의 다양한 부분에 대응하는 단편을 연결함으로써 제조된, 혼합된 게놈 및 합성, 혼합된 합성 및 cDNA 또는 혼합된 게놈 및 cDNA 기원의 DNA로부터 제조될 수 있다.

임의적 돌연변이유발

본 발명의 방법의 단계 (a)에 따라 실행된 모 지질분해효소를 암호화하는 DNA 서열의 임의적 돌연변이유발은 이 기술분야에서 공지된 어떤 방법의 사용에 의해 편리하게

실행될 수 있다.

예를들어, 임의적 돌연변이유발은 적당한 물리적 또는 화학적 돌연변이유발제의 사용, 적당한 올리고뉴클레오타이드의 사용, 또는 DNA 서열을 PCR 발생 돌연변이유발을 받게 하는 것에 의해 실행될 수 있다. 더구나, 임의적 돌연변이유발은 이들 돌연변이유발제의 어떤 조합의 사용에 의해 실행될 수도 있다.

돌연변이유발제는 예를들어 전이, 변위(transversion), 역위(inversion), 스캐램블링, 결실, 및/또는 삽입을 유도하는 것일 수 있다.

본 발명의 목적에 적당한 물리적 또는 화학적 돌연변이유발제의 예는 자외선(UV) 조사, 히드록실아민, N-메틸-N'-니트로-N-니트로소구아니딘(MNNG), O-메틸 히드록실아민, 아질산, 에틸메탄술포네이트(EMS), 중아황산나트륨, 포름산, 및 뉴클레오타이드 유사체를 포함한다.

그러한 약제를 사용하면 돌연변이유발은 전형적으로 돌연변이유발이 일어나기에 적당한 조건하에서 선택한 돌연변이유발제의 존재에서 돌연변이될 모호소를 암호화하는 DNA 서열을 배양하고, 원하는 성질을 갖는 돌연변이된 DNA를 선택함으로써 실행된다.

돌연변이유발이 올리고뉴클레오타이드의 사용에 의해 실행될 때 올리고뉴클레오타이드는 변경되기를 원하는 위치에서 올리고뉴클레오타이드의 합성 동안에 3개의 비-모 뉴클레오타이드로 도핑 또는 스파이킹 될 수 있다. 도핑 또는 스파이킹은 원하지 않는 아미노산에 대한 코돈을 피할 수 있도록 실행될 수도 있다. 도핑 또는 스파이킹된 올리고뉴클레오타이드는 예를들어 PCR, LCR 또는 어떤 DNA 폴리머라제 및 리가제를 사용하는 어떤 공개된 기술에 의해 지질분해효소를 암호화하는 DNA로 합체될 수 있다.

PCR 발생 돌연변이유발이 사용될 때, 모 지질분해효소를 암호화하는 화학적으로 처리되거나 아니면 미처리된 유전자를 뉴클레오타이드의 잘못 합체됨을 증가시키는 조건 하에서 PCR을 시킨다(Deshler 1992, Leung et al. 1989).

E. Coli (Fowler et al. 1974), *S. cerevisiae* 또는 어떤 다른 미생물 유기체의 돌연변이 균주는 예를들어 모효소를 함유하는 플라스미드를 돌연변이 균주로 형질전환하고, 플라스미드를 갖는 돌연변이 균주를 성장시키고 돌연변이 균주로부터 돌연변이된 플라스미드를 분리함으로써 지질분해효소를 암호화하는 DNA의 임의적 돌연변이유발에 사용될 수 있다. 이어서 돌연변이된 플라스미드는 발현 유기체로 형질전환될 수 있다.

돌연변이유발될 DNA 서열은 편리하게 모 지질분해효소를 발현하는 유기체로부터 제조된 게놈 또는 cDNA 라이브러리에 존재될 수 있다. 대안으로, DNA 서열은 플라스미드 또는 박테리오파지 같이 적당한 벡터에 존재할 수 있고, 이것은 그 자체로 돌연변이유발제와 함께 배양하거나 그렇지 않으면 거기에 노출시킬 수도 있다. 또한 돌연변이유발될 DNA는 숙주세포의 게놈에 합쳐지거나 또는 세포에 온닉된 벡터에 존재함으로써 상기 세포에 존재할 수 있다.

최종적으로, 돌연변이유발될 DNA는 분리된 형태일 수도 있다. 임의적 돌연변이유발을 받게되는 DNA 서열은 바람직하게는 cDNA 또는 게놈 DNA 서열임이 이해될 것이다.

어떤 경우에는 발현 단계(b) 또는 스크리닝 단계(c)가 실행되기에 앞서 돌연변이된 DNA 서열을 증폭시키는 것이 편리할 수도 있다.

그러한 증폭은 이 기술분야에서의 공지된 방법에 따라서 실행될 수 있는데, 현재 바람직한 방법은 모효소의 DNA 또는 아미노산 서열을 기초로 제조된 올리고뉴클레오티드 개시제를 사용하는 PCR 발생 증폭이다.

돌연변이유발제와 배양 또는 거기에 노출시킨 다음에 돌연변이된 DNA는 발현이 일어나는 것을 허용하는 조건하에서 DNA 서열을 지니는 적당한 숙주 세포를 배양함으로써 발현된다. 이 목적을 위해 사용된 숙주세포는 임의로 벡터에 존재하는 돌연변이된 DNA 서열로 형질전환되어진 것, 또는 돌연변이유발 처리동안에 모효소를 암호화하는 DNA 서열을 지닌 것일 수 있다.

적당한 숙주세포의 예는 다음에 주어진다. 돌연변이된 DNA 서열은 이것의 발현을 허용하는 기능을 암호화하는 DNA 서열을 더 포함할 수도 있다.

상기 단계 (c)에서 언급된 스크리닝 기준은 조심스럽게 선택된 것으로 이해될 것이다. 따라서 어떤 이론에도 제한되지 않고 칼슘에 대해 감소된 의존성에 대한 스크리닝은 특히, 단지 소량의 유리된 칼슘이온이 있는 조건하에서 칼슘에 대한 요구치가 광학활성에 대한 제한 요소로 생각될 수도 있는 점에서 전면적인 개선된 성능을 갖는 변이체를 가져오는 것으로 생각된다. 세제 리파제와 관련하여 요구되는 유리 칼슘 이온은 보통 세척수로부터 제공되고 따라서 지질분해활성은 물의 칼슘함량에 의존한다.

변이체가 개선된 내성을 갖는 세제 또는 세제 성분은 예를들어 다음에 더 기술하는 바와 같은 어떤 유형일 수 있다. 바람직하게는, 세제 성분은 비이온성, 음이온성, 양이온성, 양성 이온성 또는 양쪽성 계면활성제이다. 비이온성 계면활성제의 예는 알코올 에톡실레이트를 포함하고, 음이온성 계면활성제의 예는 LAS, 알킬술페이트, 알코올 에톡시술페이트 등을 포함한다.

특히, 비이온성 계면활성제 알코올 에톡실레이트(이것의 시중구입되는 예로 Dobanol® 이 있다)에 대한 개선된 내성은 개선된 세척 성능의 표시인 것으로 생각된다.

단계(c)의 스크리닝은 다음 원리에 기초를 둔 필터 분석법의 사용으로 편리하게 실행된다:

관심있는 돌연변이된 지질분해효소를 발현할 수 있는 미생물을 적당한 배지 및 효소가 분비되기에 적당한 조건에서 배양되고, 이때 배지는 첫번째 단백질 결합 필터와 그 상부에 저단백질 결합 능력을 나타내는 두번째 필터로 이루어지는 이중필터를 갖추고 있다. 미생물은 두번째 필터에 위치해 있다. 배양을 한 다음에, 미생물로부터 분비된 효소로 이루어지는 첫번째 필터는 미생물로 이루어지는 두번째 필터로부터 분리된다.

첫번째 필터는 원하는 효소활성에 대해 스크리닝을 받게 하고 두번째 필터에 존재하는

대응하는 미생물 콜로니를 확인한다.

효소 활성을 결합하는데 사용되는 필터는 예를들어 나일론 또는 니트로셀룰로스같은 어떤 단백질 결합필터도 될 수 있다. 발현 유기체의 콜로니를 지니는 상부 필터는 예를 들어 셀룰로스 아세테이트 또는 Durapore™ 같은 단백질을 결합하는 친화력이 없거나 또는 적은 어떤 필터도 될 수 있다. 필터는 스크리닝에 사용될 수 있는 어떤 조건으로도 예비처리될 수 있거나 또는 효소활성의 검출동안에 처리될 수 있다.

효소활성은 염료, 형광, 침전, pH 지시약, IR-흡광도 또는 효소활성의 검출을 위한 어떤 다른 공지의 기술에 의해 검출될 수 있다.

검출하는 화합물은 예를들어 아가로스, 한천, 젤라틴, 폴리아크릴아미드, 전분, 여과지, 천 같은 어떤 고정제; 또는 고정제들의 어떤 조합에 의해서 고정될 수 있다.

리파제 활성은 예를들어 올리브오일 또는 라드같은 지질과의 조합으로 Brilliant green, Rhodamine B 또는 Sudan Black에 의해 검출될 수 있다.

개선된 세척 성능을 갖는 모 지질분해효소의 변이체를 확인하기 위한 스크리닝 기준은 예를들어 EGTA, EDTA, 비이온성 또는 음이온성 계면활성제, 알칼리성 pH, 또는 효소 활성의 상기 검출방법중의 하나와의 조합으로 어떤 세제 조성물일 수 있다.

본 발명의 필터 분석법에 사용되는 스크리닝 기준은 원하는 성질 또는 스크리닝되는 효소 사용에 용하도록 선택될 수 있다.

예를들어, 종지와 펄프 공업에의 구체적인 용도의 리파제에 대한 스크리닝에서, 증가된 온도 안정성을 갖는 산 리파제에 대해 스크리닝하는 것이 관련될 수 있다.

이것은 산성의 pH(예를들어 pH 4)의 완충액을 사용함으로써 실행될 수 있고 및/또는 분석전에 또는 분석하에 더 높은 온도에서 배양할 수 있다.

단계(c)에서 생산된 숙주세포는 상기 단계(a)-(c)에서 정의한 바와 같은 돌연변이 유발을, 이전의 돌연변이유발 처리에 쓰인 것보다 더 엄격한 선택 기준을 사용함으로써

편리하게 더이상의 횃수를 받게 할 수도 있다.

단계(c)에서 선택된 숙주세포는 지질분해효소의 변이체의 제조에 직접 사용될 수 있다. 대안으로, 변이체를 암호화하는 DNA를 편리하게는, 적당한 숙주세포도 열거되어 있는 "본 발명의 변이체의 발현"이라는 제목의 단원에서 하기에 기술된 방법의 사용에 의해 숙주세포로부터 분리하고 또다른 적당한 숙주세포에 삽입할 수 있다.

국소화된 임의적 돌연변이유발

본 발명에 따라서 임의적 돌연변이유발은 문제의 모 지질분해효소의 일부에 유리하게 위치할 수 있다. 이것은 예를들어, 효소의 어떤 부위가 효소의 주어진 성질에 대해 특히 중요한 것으로 확인되었을 때 유리할 수 있고, 변형되면 개선된 성질을 갖는 변이체를 가져오는 것으로 기대된다. 그러한 부위는 모효소의 3차구조가 밝혀지고 효소의 작용에 관련되어질 때 보통 확인될 수 있다.

국소화된 임의적 돌연변이유발은 상기한 바와 같이 PCR 발생 돌연변이유발 기술 또는 이 분야에서 공지된 어떤 다른 기술의 사용으로 편리하게 실행된다.

대안으로 변형될 DNA 서열의 부분을 암호화하는 DNA 서열은 예를들어 적당한 벡터에 삽입됨으로써 분리될 수 있고, 이어서 상기 부분은 상기 논의된 돌연변이유발 방법중 어떤 것을 사용하여 돌연변이유발을 일으킬 수 있다.

모 지질분해효소

본 발명에 따라서 변형될 모 지질분해효소는 상기한 바와 같은 지질분해활성을 갖는 어떤 효소일 수 있다.

지질분해효소의 예는 리파제, 에스테라제, 쿠티나제 및 포스포리파제를 포함한다.

바람직하게는, 모 지질분해효소는 지질 접촉대 또는 상기 접촉대의 일부를 암호화하는 DNA 서열의 일부에서 실행된 국소화된 임의적 돌연변이유발에 의해 변형된다.

지금까지 결정화된 모든 리파제는 리파제가 불활성 형태(그러한 리파제의 예는 Brady et al., 1990에 의해 기술됨)일 때 활성 부위를 덮는 적어도 하나의 표면 루프 구조(또한 리드(lid) 또는 플랩(flap)이라고 부른다)로 이루어지는 것이 발견되었다.

리파제가 활성화될 때, 루프구조는 활성부위의 잔기가 노출되도록 이동되고, 증가된 표면 소수성을 가지며 가수분해할 때 또는 그동안 지질의 기질과 상호작용하는 소수성 표면이 활성부위 Ser을 에워싸여 만들어진다.

이 활성화는 계면 활성화라 부르고 Tilbeurgh et al. (1993)에 의해 더 논의된다.

본 발명의 목적을 위하여, 활성화시 만들어지는 표면을 "지질 접촉대"라고 부르고 임의적으로 루프 구조의 형태로 이 표면 내부에 위치되거나 일부를 형성하는 아미노산 잔기를 포함하는 것을 말한다. 이들 잔기는 리파제가 지질 표면과 접촉하여 활성화될 때 지질상으로부터 트리글리세리드를 가수분해하는 경우 가수분해할 때 또는 그동안 기질과의 리파제 상호작용에 관여할 수도 있다.

지질 접촉대는 가수분해전에 단하나의 지질 기질 분자가 결합하는 지질 접촉대의 부분인 지질 기질에 대한 결합부위를 함유한다. 다시 이 결합부위는 활성부위 Ser 주위에 위치한 아실 결합 소수성 파면 및 소위 가수분해 장소라고 하는 곳을 함유하고 여기서 지질 기질의 가수분해가 일어난다고 생각된다.

오늘날 공지된 모든 리파제에서 지질 접촉대는 예를들어, 적당한 컴퓨터 프로그램에 의해 만들어진 리파제의 3차원 구조로부터 쉽게 인식된다.

불활성 및 활성화된 리파제의 구조는 각각 WO 92/05249의 도면 1 및 2에 나타나 있다.

본 출원에서 자세히 논의된 *Humicola lanuginosa* 리파제의 지질 접촉대는 아미노산 잔기 21-25, 36-38, 56-62, 81-98, 110-116, 144-147, 172-174, 199-213 및 248-269에 의해 정의된다. 이들 잔기는 리파제와 지질 기질 사이의 상호작용의 컴퓨터 모델 모의 실험을 기초로 하여 확인되었다.

다른 지질분해효소의 지질 접촉대는 다음의

- a) 3차원 분자 구조의 소수성 벡터를 계산하고,
- b) 선형 서열에서 활성 부위 세린 다음의 2차 아미노산 잔기의 $C\alpha$ -원자를 통하여 벡터와 수직으로 절단부를 만들고,
- c) 벡터가 가리키는 절단부의 쪽에 적어도 한 원자를 갖는 모든 잔기를 포함하고
- d) 단백질의 표면의 5Å 내에서 적어도 한 원자를 갖는 것들을 이들 잔기로부터 선택함으로써 정의된다(개방 또는 폐쇄 형태의 리파제의 경우).

소수성 벡터는 적어도 10%의 계면 접근 가능성을 갖는 잔기에 대해 모든 잔기를 합함으로써(Lee, B. 및 Richards, F. M. 1971. Mol. Biol. 55: 379-400) 개방 또는 폐쇄 형태중의 어느하나의 리파제의 경우에서 단백질 구조로부터 계산된다. 잔기 벡터의 출발점은 잔기의 $C\alpha$ -원자로 정의되고 그 방향은 측쇄의 질량 중심을 통한다.

각 잔기 벡터의 크기는 잔기 상대적인 이동 자유 에너지로 정의된다.

각 잔기의 표면접근가능성은 콘놀리(Connolly) 프로그램을 사용하여 계산된다.

바람직하게는 국소화된 임의적 돌연변이유발은 모 리파제의 리드 부위 및/또는 소수성의 갈라진 틈을 암호화하는 DNA 서열의 부분, 또는 상기 리드 부위 및/또는 소수성의 갈라진 틈의 부분에서 실행된다.

본 발명에 따라 변형되는 모 지질분해효소는 어떤 기원의 것도 될 수 있다.

따라서 효소는 포유동물, 식물, 척추동물 또는 어떤 다른 부위의 것일 수 있다.

그러나, 수많은 미생물 균주가 세계 목적을 위한 구체적 용도의 효소를 생산하는 것이 발견된 점에서 효소가 미생물 기원이라고 보는 것이 현재 바람직하다.

보다 구체적으로, 모 지질분해효소의 DNA 서열은 균류, 즉 효모 또는 사상균으로부터 유도될 수 있다. 예를들어, DNA 서열은 다음으로부터 유도가 가능한 것일 수 있는데, 이것은 예를들어, *H. lanuginosa* 같은 *Humicola* sp.의 균주, 예를들어, *Rh. miehei* 같은

Rhizomucor sp.의 균주, Rhizopus sp.의 균주, Candida sp.의 균주, 예를들어 *F. solani* pisi 같은 *Fusarium* sp.의 균주, 예를들어 *V. inaequalis* 같은 *Venturia* spp.의 균주, 예를들어, *C. gloeosporioides*, 또는 *C. lagenarium* 같은 *Colletotrichum* spp.의 균주, 예를들어, *P. spinulosum* 또는 *P. camembertii* 같은 *Penicillium* spp.의 균주이다.

본문에서 "유도가능한"은 문제의 유기체의 균주에 의해 만들어진 효소를 지정할 뿐만 아니라, 그러한 균주로부터 분리된 DNA 서열에 의해 암호화되고 상기 DNA 서열로 형질전환된 숙주 유기체에서 생산된 효소를 의미한다.

더구나, 이 용어는 합성 및/또는 cDNA 근원의 DNA 서열에 의해 암호화되고 문제의 효소의 확인되는 특성을 갖는 효소를 가리킨다.

모 지질분해효소로서 특히 관심있는 것은 예를들어 *H. lanuginosa* 균주 DSM 4109 같은 *H. lanuginosa*의 균주로부터 유도가능한 리파제이거나, 또는 *Rh. mucor*의 균주, 또는 *C. antarctica*의 균주인 상기 리파제의 유사체이다.

본문에서 "유사체"란 용어는, 하나이상의 아미노산 잔기가 *H. lanuginosa* 리파제의 것과 다른 아미노산 서열로 이루어지며, 상기 리파제의 아미노산 서열과 적어도 70% 상동성, (2개의 서열 사이의 동일한 정도로 측정), 예를들어 적어도 75%, 80%, 90%, 또는 95% 상동성이고, 면역학적으로 상기 리파제와 교차반응성이고 및/또는 상기 리파제의 아미노산 서열 또는 상기 리파제를 암호화하는 DNA 서열을 기초로 제조된 올리고뉴클레오티드 탐침과 혼성화하는 DNA 서열에 의해 암호화되는 폴리펩티드를 포함함을 뜻한다.

유사체는 *H. lanuginosa* 리파제의 유도체일 수 있는데, 이것은 예를들어 리파제의 N- 및 C-말단부 중의 하나 또는 둘다에 하나이상의 아미노산 잔기의 첨가, 아미노산 서열의 하나이상의 다른 부위에서 하나이상 아미노산 잔기의 치환, 리파제의 단부중의 하나 또는 둘다 또는 아미노산 서열의 하나이상의 부위에서 하나이상의 아미노산 잔기의

결실, 또는 아미노산 서열의 하나이상의 부위에서 하나이상의 아미노산 잔기의 삽입을 가져오는 리파제를 암호화하는 DNA 서열을 변형함으로써 제조된다.

DNA 서열의 변형은 부위 지정 또는 임의적 돌연변이유발 또는 공지의 방법을 따른 이들 기술의 조합에 의해 실행될 수 있다.

더구나, 유사체는 상기 "발명의 배경" 단원에서 언급된 것중의 하나와 같은 또다른 유기체로부터 유도된 폴리펩티드일 수 있다.

관련 올리고뉴클레오타이드 탐침(들)을 갖는 모 *H. lanuginosa* 리파제의 유사체를 암호화하는 DNA 서열의 혼성화는 DNA 서열을 혼성화되게 하는 어떤 적당한 조건 하에서 시행될 수 있다. 예를들어, 그러한 조건은 명시된 조건, 예를들어 5 x SSC에 미리 담그고 20% 포름아미드, 5 x 덴하르트 용액, 50mM 인산나트륨, pH 6.8, 및 50 μ g의 변성된 초음파로 분해된 송아지 흉부 DNA의 용액에서 $\sim 40^{\circ}\text{C}$ 에서 1시간동안 예비 혼성화시키고, 이어서 $\sim 40^{\circ}\text{C}$ 에서 18시간동안 100 μ M ATP로 보충된 동일한 용액에서 혼성화를 수반하는 조건하에서의 혼성화이거나 또는 예를들어 Sambrook 등(et al., 1989)에 의해 기술된 다른 방법이다.

H. lanuginosa 리파제의 유사체의 면역학적인 교차반응성은 정제된 리파제의 적어도 한 에피토프(epitope)에 대하여 길러지거나 또는 그것과 반응성인 항체를 사용하여 분석될 수 있다. 단클론성 또는 다클론성일 수도 있는 항체는 이 기술분야의 공지의 방법, 예를들어 Hudson 등(et al., 1989)에 의해 기술된 방법으로 제조된다. 면역학적인 교차 반응성은 이 분야의 공지의 분석법을 사용하여 측정될 수 있고, 이 예는 Hudson 등(et al., 1989)에 의해 기술된 바와 같은 Western Blotting 또는 방사 면역확산 분석법이다.

모 지질분해효소가 균주 DSM 4109 또는 그 유사체로부터 얻을 수 있는 *H. lanuginosa* 리파제일 때, 임의적 돌연변이유발을 일으키는 DNA 서열은 상기 리파제의 아미노산 잔기 21-27, 56-64, 81-99, 83-100, 108-116, 145-147, 174, 202-213, 205-211,

226-227, 246-259 또는 263-269 잔기에 의해 정의된 부위중 적어도 한 부위를 암호화하는 DNA 서열의 부분으로 이루어지거나 또는 그 부분을 구성한다.

상기 리파제의 DNA 및 아미노산 서열은 각각 SEQ ID Nos. 1 및 2로부터 명백하다.

국소화된 임의적 돌연변이유발은 하나이상의 이들 부위에서 실행될 수 있고, 바람직하게는 적어도 2개의 부위에서 실행된다.

본 발명에 따라 변형시킬 모 지질분해효소는 박테리아로부터 유도될 수 있다.

예를들어, 모 지질분해효소를 암호화하는 DNA 서열은 *P. cepacia*, *P. alcaligenes*, *P. pseudoalcaligenes*, *P. mendocina* (또한 *P. putida*라고도 부름), *P. syringae*, *P. aeruginosa* 또는 *P. fragi* 같은 *Pseudomonas* spp.의 균주, *B. subtilis* 또는 *B. pumilus* 같은 *Bacillus* spp.의 균주 또는 *S. scabies* 같은 *Streptomyces* sp.의 균주로부터 유도될 수 있다.

모 박테리아의 지질분해효소는 상기 언급된 종의 어떤 것, 예를들어 EP 218 272, EP 331 376 및 EP 407 225에 기술된 바와 같은 *Pseudomonas* 리파제, 또는 WO 88/09367에 기술된 바와 같은 쿠티나제로부터 유도된 리파제일 수 있다.

발명의 변이체

쉽게 참고하기 위해 본 발명의 특정 변이체들은 다음의 명명법을 사용하여 기술한다.

원래의 아미노산(들): 위치(들): 치환된 아미노산(들)

이 명명법에 따르면, 예를들어 96 위치에서 아스파르트산을 발린으로 치환하는 것은 다음과 같이 나타낸다:

Asp 96 Val 또는 D96V

동일한 위치에서 아스파르트산의 결실은 다음과 같이 나타낸다:

Asp 96* 또는 D96*

및 리신 같은 추가의 아미노산 잔기의 삽입은 다음과 같이 나타낸다:

Asp 96 ValLys 또는 D96VK

다수의 돌연변이는 플러스 부호로 분리한다, 즉:

Asp 96 Val + Glu 87 Lys 또는 D96V + E87K

는 96 및 87 위치에서 각각 아스파르트산 및 글루탐산을 발린 및 리신으로 치환하는 돌연변이를 나타낸다.

하나이상의 대안의 아미노산 잔기가 주어진 위치에서 삽입될 때 이것은 다음과 같이 나타낸다.

D96V, N 또는

D96V 또는 D96N

더 나아가서, 어떤 특정 변형을 제안하지 않고 변형하기 적당한 위치를 확인할 때 어떤 아미노산 잔기도 그 위치에 존재하는 아미노산 잔기를 치환할 수 있는 것으로 이해된다. 따라서, 예를들어, 96 위치에서, 명시하지는 않으나 아스파르트산의 변형을 말할 때, 아스파르트산은 결실되거나 또는 어떤 다른 아미노산, 즉 R, N, A, C, Q, E, G, H, I, L, K, M, F, P, S, T, W, Y, V, 또는 그 위치에서 삽입된 더이상의 아미노산 잔기를 치환할 수 있다.

최종적으로, 모 H. lanuginosa 리파제의 돌연변이를 여기서 확인할 때(상기 정의한 바와 같은)상기 리파제의 유사체의 유사돌연변이를 포함하는 것으로서 이해됨을 뜻한다.

본 발명의 다른 양상은 본 발명의 상기 기술된 방법에 의해 구성된 변이체에 관한 것이다.

모 지질분해효소가 상기한 바와 같이 균주 DSM 4109로부터 얻을 수 있는 H. lanuginosa 리파제 또는 그것의 유사체일 때, 변이체는 다음의 위치중 적어도 한 곳에서의 돌연변이로 이루어지는 것이 바람직하다:

S58, T64, S83, N94, K98, I100, A121, E129, D167, R205, K237, I252, P256 또는 G263. 바꾸는 경우에, 야생형의 아미노산 잔기 이외의 어떤 아미노산 잔기, 예를들면 R, N, A, C, Q, E, G, H, I, L, K, M, F, P, S, T, W, Y, V, D로부터 선택된 아미노산 잔기가 삽입될 수 있음이 이해될 것이다.

본 발명자가 아는한, 이들 위치내에서의 특이적인 돌연변이의 개시가 이전에는 없었다. 게다가 본 발명은 DSM 4109로부터 얻을 수 있는 *H. lanuginosa* 리파제 또는 이 리파제의 유사체의 변이체에 관한 것으로, 여기서 아미노산 잔기 L264는 루신과는 다른 아미노산, 즉 R, N, A, C, Q, E, G, H, I, K, M, F, P, S, T, W, Y, V, D의 어느 하나에 의해 치환되었다.

바람직하게는, 본 발명에 따른 변이체는 다음의 돌연변이 K46R, E57G, G61S, S83T, S58F, D62C, T64R, I90F, G91A, N92H, N94I, N94K, L97M, K98I, I100V, D102K, A121V, E129K, D167G, R205K, E210W, K237M, N259W, I252L, D254W, P256T, G263A, L264Q 또는 T267W 중 적어도 하나로 이루어진다.

이들 위치는 밝혀졌거나 또는 효소활성 및/또는 세제 내성을 위해 중요한 것으로 생각된다. 아미노산 잔기의 번호매김은 성숙한 리파제의 아미노산 서열을 말한다.

바람직하게는, 본 발명의 이러한 양상에 따른 변이체는 다음의 돌연변이 S83T, N94T, A121V, D167G, R205K 중의 적어도 하나로 이루어진다.

본 발명은 여기서 정의된 돌연변이의 둘 이상의 조합, 또는 WO 92/05249, WO 94/25577 및 WO 94/01541에 개시된 돌연변이중 어느것과 여기에 정의된 돌연변이의 하나 이상의 조합으로 이루어지는 모 *H. lanuginosa* 리파제의 변이체를 포함한다.

본 발명의 다른 양상은 다음의 돌연변이중 적어도 하나로 이루어지는 DSM 4109로부터 얻을 수 있는 *H. lanuginosa* 리파제 또는 그것의 유사체의 변이체에 관한 것이다:

N94K+D96A
S83T+N94K+D96N
E87K+D96V
E87K+G91A+D96A
N94K+F95L+D96H

A121V+R205K+E210Q
F95C+D96N
G91S+L93V+F95C
E87K+G91A+D96R+I100V
E87K+G91A
S83T+E87K+Q249R
S83T+E87K+W89G+G91A+N94K+D96V
N73D+S85T+E87K+G91A+N94K+D94A
E87K+G91A+L93I+N94K+D96A
D167G+E210V
N73D+E87K+G91A+N94I+D96G
S83T+E87K+G91A+N92H+N94K+D96M
E210W
E56T+D57L+I90F+D96L+E99K
E56R+D57L+V60M+D62N+S83T+D96P+D102E
D57G+N94K+K96L+L97M
E87K+G91A+D96R+I100V+E129K+K237M+I252L+P256T+G263A+L264Q
E56R+D57G+S58F+D62C+T64R+E87G+G91A+F95L+D96P+K98I+K237M
K46R+E56R+G61S
D102K
D167G
N73D+E87K+G91A+N94I+D96G
E210V
E210W
N251W+D254W+T267W
S83T+E87K+G91A+N92H+N94K+D96M
E56R+I90F+D96L+E99K
D57G+N94K+D96L+L97M

이들 변이체는 칼슘에 대해 감소된 내성 및/또는 비이온성 계면활성제로 알코올 에톡실레이트 같은 세제 성분에 대해 개선된 내성을 나타내는 것으로 밝혀졌고, 따라서 세제 또는 식기세척 목적을 위한 구체적인 용도가 생각된다. 변이체는 본 발명의 방법에 의해 구성되었고 다음에 도입된 돌연변이에 관하여 특성화되며 이후의 실시예에서 더욱 기술된다. 이들 변이체를 구성하는 대안의 방법은 적당한 올리고뉴클레오타이드 탐침을 사용하는 부위-지정된 돌연변이 유발을 기초로 함이 분명할 것이다.

이 방법은 실시예 3-6에서 예시된다.

본 발명의 변이체의 발현

본 발명에 따르면, 상기 기술한 방법, 또는 이 분야의 어떤 대안의 공지 방법에 의해 제조된 변이체 지질분해효소를 암호화하는 돌연변이된 DNA 서열은 촉진 유전자, 작동 유전자, 리보솜 결합부위, 번역개시신호, 및 임의로 억제유전자 또는 다양한 활성유전자를 암호화하는 제어서열을 일반적으로 포함하는 발현 벡터를 사용하여 효소 형태에서 발현될 수 있다.

본 발명의 변이체를 암호화하는 DNA 서열을 수반하는 재조합 발현 벡터는 재조합 DNA 과정을 편리하게 시킬 수 있는 어떤 벡터일 수 있고, 벡터의 선택은 도입할 숙주 세포에 종종 의존할 것이다. 따라서, 벡터는 자율적으로 복제하는 벡터, 즉 염색체외의 구성요소로 존재하는 벡터일 수 있고, 이것의 복제는 염색체 복제에는 독립적인데, 예를 들어 플라스미드, 박테리오파지 또는 염색체외 요소, 소형 염색체 또는 인공 염색체이다. 대안으로, 벡터는 숙주세포에 도입될 때 숙주세포게놈으로 합쳐지고 합쳐진 염색체(들)와 같이 복제되는 것일 수 있다.

벡터에서, DNA 서열은 적당한 촉진유전자 서열에 조작가능하게 연결되어야 한다.

촉진유전자는 선택한 숙주세포에서 전사 활성을 나타내는 어느 DNA 서열일 수 있고

숙주세포에 대해 상동적 또는 비상동적 중의 하나인 단백질을 암호화하는 유전자로부터 유도될 수 있다. 특히 박테리아 숙주에서, 본 발명의 변이체를 암호화하는 DNA 서열의 전사를 지정하는 적당한 촉진유전자의 예는, *E. coli*의 lac 오페론의 촉진유전자, *Streptomyces coelicolor* 아가라제 유전자 dagA 촉진유전자, 예를들어 WO 93/10249에 기술된 *Bacillus licheniformis* α -아밀라제 유전자의 촉진유전자(amyL), *Bacillus stearothermophilus* 말토 아밀라제 유전자의 촉진유전자(amyM), *Bacillus amyloliquefaciens* α -아밀라제의 촉진유전자(amyQ), *Bacillus subtilis* xylA 및 xylB 유전자등의 촉진 유전자이다. 균류의 숙주에서 전사를 위한 유용한 촉진 유전자의 예는 *A. oryzae* TKA 아밀라제, *Rhizomucor miehei* 아스파르트 프로테이나제, *A. niger* 중성 α -아밀라제, *A. niger* 산 안정한 α -아밀라제, *A. niger* 글루코아밀라제, *Rhizomucor miehei* 리파제, *A. oryzae* 알칼리성 프로테아제, *A. oryzae* 트리오스 포스페이트 이성질화효소 또는 *A. nidulans* 아세트아미다제를 암호화하는 유전자로 유도된 것이다.

본 발명의 발현 벡터는 또한 적당한 전사 종식 유전자와, 진핵생물에서는 본 발명의 변이체를 암호화하는 DNA 서열에 조작가능하게 연결된 폴리아데닐화 서열로 이루어질 수 있다. 종식유전자 및 폴리아데닐화 서열은 촉진유전자와 같은 원천으로부터 적당히 유도될 수 있다.

벡터는 문제의 숙주세포에서 벡터가 복제되는 것을 가능하게 하는 DNA 서열을 더 포함할 수 있다. 그러한 서열의 예는 플라스미드 pUC19, pACYC177, pUB110, PE194, pAMB1 및 pIJ702의 복제의 기원이다.

또한, 벡터는 선택가능한 표시, 예를들어 *B. subtilis* 또는 *B. licheniformis*로부터의 dal 유전자 같이 유전자의 산물이 숙주세포 결함을 보충해주는 유전자, 또는 암피실린, 카나마신, 클로르암페니콜이나 테트라시클린 내성 같이 항생물질의 내성을 주는 것으로 이루어질 수 있다.

더구나, 벡터는 amdS, argB, niaD 및 sC 같은 Aspergills 선택표시(표시는 히그로미신 내성을 일으킨다)로 이루어질 수 있고, 또는 선택은 예를들어 WO 91/17243에 기술된 바와 같은 공-형질전환에 의해 이루어질 수 있다.

세포내 발현이 어떤 점에서는, 예를들어 숙주세포로서 어떤 박테리아를 사용할 때, 유리하게 될 수 있는 반면에, 발현은 세포밖에서 일어나는 것이 일반적으로 바람직하다. 모 지질분해효소는 본질적으로 배지로 발현된 효소의 분비를 허용하는 예비부위로 이루어질 수 있다.

원한다면, 이 예비부위는 다른 예비부위 또는 신호 서열에 의해 치환가능하고, 각 예비부위를 암호화하는 DNA 서열의 치환에 의해 편리하게 이루어질 수 있다.

모 지질분해효소의 변이체를 암호화하는 본 발명의 DNA 구조물, 촉진유전자, 종식 유전자 및 다른 요소를 연결하고 이것들을 복제하는데 필요한 정보를 함유하는 적당한 벡터로 삽입하기 위해 사용된 방법은 이 분야의 숙련자에게 잘 알려져 있다(참고로, 예를들어, Sambrook et al. (1989)).

상기 정의한 본 발명의 DNA 구조물 또는 발현벡터중의 하나로 이루어지는 본 발명의 세포는 본 발명의 모 지질분해효소의 변이체의 재조합 생산에서 숙주세포로 유리하게 사용된다. 세포는 편리하게는 숙주염색체에서 숙주 DNA 구조물을 통합함으로써 변이체를 암호화하는 본 발명의 DNA 구조물로 형질전환될 수 있다. 일반적으로 이런 통합은 DNA 서열이 세포안에서 더욱 안정하게 유지되기 쉽기 때문에 유리하다고 생각된다. 숙주 염색체로의 DNA 구조물의 통합은 종래의 방법, 예를들어 상동적 또는 비종적 재조합에 의해 실행될 수 있다. 대안으로, 세포는 숙주세포의 다른 유형과 관련하여 하기에 기술된 발현 벡터로 형질전환될 수 있다.

본 발명의 세포는 포유동물 또는 곤충같이 더 고등한 유기체의 세포일 수 있지만 미생물의 세포, 예를들어 박테리아 또는 균류(효모도 포함) 세포인 것이 바람직하다.

적당한 박테리아의 예는

Bacillus subtilis, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus lentus*,
Bacillus brevis, *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus alkalo-*
philus, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus coagulans*,
Bacillus circulans, *Bacillus lautus*, *Bacillus megaterium*, *Ba-*
cillus thuringiensis, 또는 *Streptomyces lividans* 또는 *Streptomyces*

murinus 같은 그람양성의 박테리아, 또는 *E. coli* 같은 그람음성의 박테리아이다.

박테리아의 형질전환은 예를들어 원형질체 형질전환에 의해 또는 방법 자체는 알려진 방법으로 적당한 세포를 사용함으로써 실행할 수 있다.

효모 유기체는 유리하게는 *Saccharomyces* 또는 *Schizosaccharomyces*의 종, 예를들어 *Saccharomyces cerevisiae*로부터 선택될 수 있다. 사상균은 *Aspergillus*의 종, 예를들어 *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus niger* 또는 *Aspergillus nidulans*에 유리하게 속한다. 사상균 세포는 방법 자체는 알려진 방법으로 원형질체 형성 및 원형질체의 형질전환과 이어서 세포벽의 재생을 포함하는 방법으로 형질전환될 수 있다.

Aspergillus 숙주세포의 형질전환을 위한 적당한 방법은 EP 238 023에 기술되어 있다.

또다른 양상에서, 본 발명은 본 발명의 모 지질분해효소의 변이체를 만드는 방법에 관한 것인데, 이 방법은 변이체의 제조를 돕는 조건하에서 상기 기술된 바와 같은 숙주 세포를 배양하고 세포 및/또는 배지에서 변이체를 회수하는 것으로 이루어진다.

세포를 배양하기 위해 사용된 배지는 문제의 숙주세포를 성장시키고 본 발명의 모 지질분해효소의 변이체의 발현을 얻기 위한 적당한 어떤 종래의 배지일 수 있다. 적당한 배지는 시중 공급자에게서 입수하거나 또는 공개된 방법에 따라 제조될 수 있다 (예를들어 아메리칸 타입 컬처 콜렉션의 카탈로그에서).

숙주세포로부터 분리된 본 발명의 변이체는 원심분리 또는 여과에 의해 세포를 배지로 부터 분리시키고, 황산암모늄같은 염으로 배지의 단백질의 성분을 침전시키고, 이어서

이어서 이온 교환 크로마토그래피, 친화성 크로마토그래피 등 같은 크로마토그래피의 방법을 포함하는 공지의 방법에 의해 배지로부터 편리하게 회수할 수 있다.

식기세척 및 세탁을 위한 세제 첨가제와 조성물

본 발명의 변이체의 칼슘에 대한 감소된 의존성 및/또는 세제 성분에 대해 개선된 내성때문에, 변이체는 세제조성물, 예를들어 pH 7-13의 범위, 보다 구체적으로 pH 8-11의 범위에서 그 성능을 나타내도록 한 세제 조성물에 보충하는데 특히 적당하다.

세제조성물

본 발명에 따라서, 본 발명의 리파제 변이체는 전형적으로 세제 조성물의 성분일 수 있다. 그 자체로서 비-분진성 과립상, 안정화된 액체, 또는 보호된 효소의 형태의 세제 조성물에 포함될 수 있다.

비-분진성 과립상은 예를들어 US 4,106,991 및 4,661,452(둘다 Novo Industri A/S임)에 기술된 바와 같이 제조되고 임의로 이 분야의 공지의 방법에 의해 코팅될 수 있다.

왁스 코팅 재료의 예는 평균 분자량이 1000-20000인 폴리(에틸렌옥시드) 제품(폴리 에틸렌글리콜, PEQ); 16-50 에틸렌옥시드 단위를 갖는 에톡시화된 노닐페놀; 알코올이 12-20개의 탄소원자를 함유하고 15-80개의 에틸렌옥시드 단위가 있는 에톡시화된 지방 알코올; 지방 알코올; 지방산; 지방산의 모노- 및 디- 및 트리글리세리드이다.

유동액 대 기술에 의한 이용에 적당한 필름-형성 코팅물질의 예는 특허 GB 1483591에 주어진다. 액체효소제제는 예를들어 확립된 방법에 따른 프로필렌글리콜같은 폴리올, 당 또는 당알코올, 락트산 또는 붕산을 첨가함으로써 안정화될 수 있다.

다른 효소 안정제는 이 분야에서 잘 알려져 있다.

보호된 효소는 EP 238,216에 개시된 방법에 따라 제조될 수 있다.

본 발명의 세제조성물은 어떤 편리한 형태, 예를들어 분말, 과립, 페이스트 또는 액체일 수 있다. 액체 세제는 전형적으로 70% 까지는 물이고 0-30%는 유기용매를 함유하는 수성, 또는 비수성일 수 있다.

세제 조성물은 하나이상의 계면활성제로 이루어지고, 이것의 각각은 음이온성, 비이온성, 양이온성, 또는 양성이온성일 수 있다.

세제는 보통 0-50%의 선형 알킬벤젠술포네이트(LAS), 알파-올레핀 술포네이트(AOS), 알킬설페이트(지방알코올 설페이트)(AS), 알코올 에톡시 설페이트(AEOS 또는 AES), 2차 알칸술포네이트(SAS), 알파-술포 지방산 메틸에스테르, 알킬 또는 알케닐숙신산, 또는 비누같은 음이온성 계면활성제를 함유한다.

또한 0-40%의 알코올 에톡실레이트(AEO 또는 AE), 카르복실화된 알코올 에톡실레이트, 노닐페놀에톡실레이트, 알킬폴리글리코시드, 알킬디메틸아민옥시드, 에톡시화된 지방산 모노에탄올아미드, 지방산 모노에탄올아미드, 또는 폴리히드록시 알킬 지방산 아미드 (예를들어 WO 92/06154에 기술됨)같은 비이온성 계면활성제를 함유한다.

세제 조성물은 하나이상의 다른 효소로 추가로 이루어질 수 있는데, 이것은 아밀라제, 풀룰라나제, 쿠티나제, 프로테아제, 셀룰라제, 퍼옥시다제, 옥시다제, (예를들어 락카제) 및/또는 다른 리파제 같은 것이다.

세제는 1-65%의 세제 빌더, 또는 지올리트, 디포스페이트, 트리포스페이트, 포스포네이트, 시트레이트, 니트릴로트리아세트산(NTA), 에틸렌-디아민테트라아세트산(EDTA), 디에틸렌트리아민펜타아세트산(DTMPA), 알킬-또는 알케닐숙신산, 용해성 실리케이트 또는 충이진 실리케이트(예를들어 Hoechst로부터의 SKS-6) 같은 착화제를 함유할 수 있다. 또한 세제는 빌더첨가되지 않을 수도 있는데, 즉 본질적으로 세제 빌더가 없을 수도 있다.

세제는 하나이상의 중합체로 이루어질 수 있다.

예는 카르복시메틸셀룰로스(CMC), 폴리(비닐피롤리돈)(PVP), 폴리에틸렌글리콜(PEG), 폴리(비닐 알코올)(PVA), 폴리아크릴레이트 같은 폴리카르복실레이트, 말레산/아크릴산 공중합체 및 라우릴 메타크릴레이트/아크릴산 공중합체이다.

세제는 테트라아세틸에틸렌디아민(TAED) 또는 노나노일옥시벤젠술포네이트(NOBS) 같은 과산-형성 표백 활성제와 합해질 수 있는 과붕산염 또는 과탄산염 같은 H_2O_2 원천으로 이루어질 수 있는 표백제를 함유할 수 있다. 대안으로, 표백제는 예를들어 아미드, 이미드, 또는 술폰형의 퍼옥시산으로 이루어질 수 있다.

본 발명의 세제 조성물의 효소는 종래의 안정화제, 예를들어 프로필렌글리콜 또는 글리세롤 같은 폴리올, 당 또는 당알코올, 락트산, 붕산, 또는 예를들어 방향족 붕산 에스테르 같은 붕산 유도체를 사용하여 안정화될 수 있고, 조성물은 예를들어 WO 92/19709 및 WO 92/19708에 기술된 바와 같이 조제될 수 있다.

또한 세제는, 예를들어, 점토를 포함하는 직물 첨가제, 거품 촉진제, 거품 억제제, 부패방지제, 흙 현탁제, 흙 재침전방지제, 염료, 살균제, 증백제 또는 향료 같은 다른 종래의 세제 성분을 함유할 수 있다.

(사용 농도에서 수용액에서 측정된) pH는 보통 중성 또는 알칼리성, 예를들어 7-11의 범위일 것이다.

본 발명의 범위내에 있는 세제 조성물의 구체적인 형태는 다음을 포함한다.

(1) 다음으로 이루어지는 적어도 600g/l의 부피밀도를 갖는 과립상으로서 조제된 세제 조성물.

선형 알킬벤젠술포네이트 (산성으로 계산)	7	-	12%
알코올 에톡시술포네이트 (예를들어 C ₁₂₋₁₈ 알코올, 1-2 EO) 또는 알킬술포네이트 (예를들어 C ₁₆₋₁₈)	1	-	4%
알코올 에톡실 레이트 (예를들어 C ₁₄₋₁₅ 알코올, 7 EO)	5	-	9%
탄산나트륨 (Na ₂ CO ₃)	14	-	20%
용해성 규산염 (Na ₂ O, 2SiO ₂)	2	-	6%
지올리트 (NaAlSiO ₄)	15	-	22%
황산나트륨 (Na ₂ SO ₄)	0	-	6%
시트르산나트륨/시트르산 (C ₆ H ₅ Na ₃ O ₇ /C ₆ H ₈ O ₇)	0	-	15%
과붕산나트륨 (NaBO ₃ ·H ₂ O)	11	-	18%
TAED	2	-	6%
카르복시매틸셀룰로스	0	-	2%
중합체(예를들어 말레산/아크릴산 공중합체,PVP, PEG)	0	-	3%
효소 (순수효소단백질로 계산)	0.0001	-	0.1%
소량성분(예를들어, 거품억제제, 향료, 증백제, 광표백제)	0	-	5%

(2) 다음으로 이루어지는 적어도 600g/l의 부피밀도를 갖는 과립상으로서 조제된 세제 조성물.

선형 알킬벤젠술포네이트 (산성으로 계산)	6 - 11%
알코올 에톡시술포이트 (예를들어 C ₁₂₋₁₈ 알코올, 1-2 EO) 또는 알킬술포이트 (예를들어 C ₁₆₋₁₈)	1 - 3%
알코올 에톡실레이트 (예를들어 C ₁₄₋₁₅ 알코올, 7 EO)	5 - 9%
탄산나트륨 (Na ₂ CO ₃)	15 - 21%
용해성 규산염 (Na ₂ O, 2SiO ₂)	1 - 4%
지올리트 (NaAlSiO ₄)	24 - 34%
황산나트륨 (Na ₂ SO ₄)	4 - 10%
시트르산나트륨/시트르산 (C ₆ H ₇ Na ₃ O ₇ /C ₆ H ₈ O ₇)	0 - 15%
카르복시메틸셀룰로스	0 - 2%
중합체(예를들어 말레산/아크릴산 공중합체, PVP, PEG)	1 - 6%
효소 (순수효소단백질로 계산)	0.0001 - 0.1%
소량성분(예를들어, 거품억제제, 향료)	0 - 5%

(3) 다음으로 이루어지는 적어도 600g/l의 부피밀도를 갖는 과립상으로서 조제된 세제 조성물.

선형 알킬벤젠술포네이트 (산성으로 제산)	5	-	9%
알코올 에톡실레이트 (예를들어 C ₁₂₋₁₅ 알코올, 7 EO)	7	-	14%
지방산같은 비누 (예를들어 C ₁₆₋₂₂ 지방산)	1	-	3%
탄산나트륨 (Na ₂ CO ₃)	10	-	17%
용해성 규산염 (Na ₂ O, 2SiO ₂)	3	-	9%
지올리트 (NaAlSiO ₄)	23	-	33%
황산나트륨 (Na ₂ SO ₄)	0	-	4%
과붕산나트륨 (NaBO ₃ ·H ₂ O)	8	-	16%
TAED	2	-	8%
포스페이트 (예를들어 EDTMPA)	0	-	1%
카르복시메틸셀룰로스	0	-	2%
중합체(예를들어 말레인산/아크릴산 공중합체, PVP, PEG)	0	-	3%
효소 (순수효소단백질로 계산)	0.0001	-	0.1%
소량성분(예를들어, 거품억제제, 향료, 착색제)	0	-	5%

(4) 다음으로 이루어지는 적어도 600g/l의 부피밀도를 갖는 과립상으로서 조제된 세제 조성물.

선형 알킬벤젠술포네이트 (산성으로 계산)	8	- 12%
알코올 에톡실레이트 (예를들어 C ₁₂₋₁₅ 알코올, 7 EO)	10	- 25%
탄산나트륨 (Na ₂ CO ₃)	14	- 22%
용해성 규산염 (Na ₂ O, 2SiO ₂)	1	- 5%
지올리트 (NaAlSiO ₄)	25	- 35%
황산나트륨 (Na ₂ SO ₄)	0	- 10%
카르복시메틸셀룰로스	0	- 2%
중합체(예를들어 말레산/아크릴산 공중합체, PVP, PEG)	1	- 3%
효소 (순수효소단백질로 계산)	0.0001	- 0.1%
소량성분(예를들어, 거품억제제, 향료)	0	- 5%

(5) 다음으로 이루어지는 수성액체세제조성물

선형 알킬벤젠술포네이트 (산성으로 계산)	15	- 21%
알코올 에톡실레이트 (예를들어 C ₁₂₋₁₅ 알코올, 7 EO 또는 C ₁₂₋₁₅ 알코올, 5 EO)	12	- 18%
지방산 같은 비누 (예를들어 올레산)	3	- 13%
알케닐숙신산	0	- 13%
아미노에탄올	8	- 18%
시트르산	2	- 8%
포스페이트	0	- 3%
중합체(예를들어 PVP, PEG)	0	- 3%
보레이트 (B ₄ O ₇)	0	- 2%
에탄올	0	- 3%
프로필렌 글리콜	8	- 14%
효소 (순수효소단백질로 계산)	0.0001	- 0.1%
소량성분(예를들어 분산제, 거품억제제, 향료, 증백제)	0	- 5%

(6) 다음으로 이루어지는 수성구조의 액체세제조성물.

선형 알킬벤젠술포네이트 (산성으로 계산)	15	- 21%
알코올 에톡실레이트 (예를들어 C ₁₂₋₁₅ 알코올, 7 EO, 또는 C ₁₂₋₁₅ 알코올, 5 EO)	3	- 9%
지방산 같은 비누 (예를들어 올레산)	3	- 10%
지올리트 (NaAlSiO ₄)	14	- 22%
시트르산 칼륨	9	- 18%
보레이트 (B ₄ O ₇)	0	- 2%
카르복시매틸셀룰로스	0	- 2%
중합체 (예를들어 PEG, PVP)	0	- 3%
예를들어 라우릴 메타크릴레이트/아크릴산 공중합체 같은 중합체를 고정; 물비 25:1 ; 분자량 3800	0	- 3%
글리세롤	0	- 5%
효소(순수효소단백질로 계산)	0.0001	- 0.1%
소량성분 (예를들어 분산제, 거품 억제제, 향료, 증백제)	0	- 5%

(7) 다음으로 이루어지는 적어도 600g/l의 부피밀도를 갖는 과립상으로서 조제된 세제 조성물.

지방 알코올 술페이트	5	- 10%
에톡시화된 지방산 모노에탄올아미드	3	- 9%
지방산 같은 비누	0	- 3%
탄산나트륨 (Na_2CO_3)	5	- 10%
용해성 규산염 (Na_2O , 2SiO_2)	1	- 4%
지올리트 (NaAlSiO_4)	20	- 40%
황산나트륨 (Na_2SO_4)	2	- 8%
과붕산나트륨 ($\text{NaBO}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$)	12	- 18%
TAED	2	- 7%
중합체 (예를들어 말레산/아크릴산 공중합체, PEG)	1	- 5%
효소 (순수효소단백질로 계산)	0.0001	- 0.1%
소량성분 (예를들어 증백제, 거품억제제, 향료)	0	- 5%

(8) 다음으로 이루어지는 과립상으로 조제된 세제조성물.

선형 알킬벤젠술포네이트 (산성으로 계산)	8	- 14%
에톡시화된 지방산 모노에탄올아미드	5	- 11%
지방산 같은 비누	0	- 3%
탄산나트륨 (Na_2CO_3)	4	- 10%
용해성 규산염 (Na_2O , 2SiO_2)	1	- 4%
지올리트 (NaAlSiO_4)	30	- 50%
황산나트륨 (Na_2SO_4)	3	- 11%
시트르산 나트륨 ($\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7$)	5	- 12%
중합체 (예를들어 PVP, 말레산/아크릴산 공중합체 효소, PEG)	1	- 5%
효소 (순수효소단백질로 계산)	0.0001	- 0.1%
소량성분 (예를들어 거품억제제, 향료)	0	- 5%

(9) 다음으로 이루어지는 과립상으로서 조제된 세제조성물.

선형 알킬벤젠술포네이트 (산성으로 계산)	6	- 12%
비이온성 계면활성제	1	- 4%
지방산 같은 비누	2	- 6%
탄산나트륨 (Na_2CO_3)	14	- 22%
지올리트 (NaAlSiO_4)	18	- 32%
황산나트륨 (Na_2SO_4)	5	- 20%
시트르산 나트륨 ($\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7$)	3	- 8%
과붕산 나트륨 ($\text{NaBO}_3\text{H}_2\text{O}$)	4	- 9%
광택 활성제 (예를들어 NOBS 또는 TAED)	1	- 5%
카르복시메틸셀룰로스	0	- 2%
중합체 (예를들어 폴리카르복실레이트 또는 PEG)	1	- 5%
효소 (순수효소단백질로 계산)	0.0001	- 0.1%
소량성분 (예를들어 증백제, 향료)	0	- 5%

(10) 다음으로 이루어지는 수성액체 세제조성물.

선형 알킬벤젠술포네이트 (산성으로 계산)	15	- 23%
알코올 에톡시술포이트 (예를들어 C ₁₂₋₁₅ 알코올, 2-3 EO)	8	- 15%
알코올 에톡실레이트 (예를들어 C ₁₂₋₁₅ 알코올, 7 EO 또는 C ₁₂₋₁₅ 알코올, 5 EO)	3	- 9%
지방산 같은 비누 (예를들어 라우르산)	0	- 3%
아미노에탄올	1	- 5%
시트르산 나트륨	5	- 10%
히드로트로프 (예를들어 톨루엔술포산나트륨)	2	- 6%
보레이트 (B ₄ O ₇)	0	- 2%
카르복시메틸셀룰로스	0	- 1%
에탄올	1	- 3%
프로필렌 글리콜	2	- 5%
효소 (순수효소 단백질로 계산)	0.0001	- 0.1%
소량성분(예를들어 중합체, 분산제, 향료, 증백제)	0	- 5%

(11) 다음으로 이루어지는 수성액체 세제조성물.

선형 알킬벤젠술포네이트 (산성으로 계산)	20	- 32%
알코올 에톡실레이트 (예를들어 C ₁₂₋₁₅ 알코올, 7 EO 또는 C ₁₂₋₁₅ 알코올, 5 EO)	6	- 12%
아미노에탄올	2	- 6%
시트르산	8	- 14%
보레이트 (B ₄ O ₇)	1	- 3%
중합체 (예를들어 말레산/아크릴산 공중합체, 예를 들어 라우릴메타크릴레이트/아크릴산 공중합체 같은 공중합체를 고정)	0	- 3%
글리세롤	3	- 8%
효소 (순수효소단백질로 계산)	0.0001	- 0.1%
소량성분(예를들어 히드로트로프, 분산제, 향료, 증백제)	0	- 5%

(12)다음으로 이루어지는 적어도 600g/l의 부피밀도를 갖는 과립상으로서 조제된 세제 조성물.

음이온성 계면활성제 (선형알킬벤젠술포네이트, 알킬 술포이트, 알파-올레핀술포네이트, 알파-술포지방산 메틸에스테르, 알칸술포네이트, 비누)	25	- 40%
비이온성 계면활성제 (예를들어 알코올 에톡실레이트)	1	- 10%
탄산나트륨 (Na_2CO_3)	8	- 25%
용해성 규산염 (Na_2O , 2SiO_2)	5	- 15%
황산나트륨 (Na_2SO_4)	0	- 5%
지올리트 (NaAlSiO_4)	15	- 28%
과붕산나트륨 ($\text{NaBO}_3 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$)	0	- 20%
표백 활성제 (TAED 또는 NOBS)	0	- 5%
효소 (순수효소 단백질로 계산)	0.0001	- 0.1%
소량성분 (예를들어 향료, 증백제)	0	- 3%

(13) 선형 알킬벤젠술포네이트의 전부 또는 부분을 (C₁₂₋₁₈)알킬술포네이트로 치환한 1)-12)에 기술된 바와 같은 세제조제물.

(14) 다음으로 이루어지는 적어도 600g/l의 부피밀도를 갖는 과립상으로서 조제된 세제 조성물.

(C ₁₂₋₁₈) 알킬술포네이트	9	- 15%
알코올 에톡실레이트	3	- 6%
폴리히드록시 알킬 지방산 아마이드	1	- 5%
지올라이트 (NaAlSiO ₄)	10	- 20%
충진인 이규산염 (예를들어 Hoechst로부터의 SK56)	10	- 20%
탄산나트륨 (Na ₂ CO ₃)	3	- 12%
용해성 규산염 (Na ₂ O, 2SiO ₂)	0	- 6%
시트르산 나트륨	4	- 8%
과탄산 나트륨	13	- 22%
TAED	3	- 8%
중합체 (예를들어 폴리카르복실레이트 및 PVP=	0	- 5%
효소 (순수효소단백질로 계산)	0.0001	- 0.1%
소량성분 (예를들어 증백제, 광표백제, 향료, 거품 억제제)	0	- 5%

변이체 0.00001-1mg(순수 효소 단백질로 계산)에 대응하는 양으로 첨가할 수 있다고 현재 생각된다.

식기 세척 조성물

식기 세척 세제 조성물은 음이온성, 비이온성, 양이온성 양쪽성 또는 이들 유형의 혼합물일 수 있는 계면활성제로 이루어진다. 세제는 0-90%의 저- 또는 비-발포(發泡)에 특화된 프로폭시화된 직쇄 알코올 같은 비이온성 계면활성제를 함유할 것이다.

세제 조성물은 무기 및/또는 유기 유형의 세제 빌더 염을 함유할 수 있다.

세제 빌더는 인-함유 및 비-인 함유 유형으로 세분될 수 있다.

일반적으로 세제 조성물은 1-90%의 세제 빌더를 함유한다.

인-함유 무기 알칼리성 세제 빌더의 예는 존재할 때 수용성 염 특히 알칼리 금속 피로포스페이트, 오르토포스페이트, 폴리포스페이트, 및 포스포네이트를 포함한다.

비-인-함유 무기 빌더의 예는 존재할 때 수용성 알칼리 금속 탄산염, 붕산염 및 규산염 뿐만 아니라 수불용성 결정형 또는 무정형 알루미늄 규산염의 다양한 유형을 포함하는데 지올리트가 가장 잘 알려진 대표적인 것이다.

적당한 유기 빌더의 예는 알칼리 금속, 암모늄 및 치환된 암모늄 시트레이트, 숙시네이트, 말로네이트, 지방산 술포네이트, 카르복시메톡시숙시네이트, 암모늄 폴리아세테이트, 카르복실레이트, 폴리카르복실레이트, 아미노 폴리카르복실레이트, 폴리아세틸 카르복실레이트 및 폴리히드록스술포네이트를 포함한다.

다른 적당한 유기 빌더는 빌더 성질을 갖는 것으로 알려진 고분자량 중합체 및 공중합체, 예를 들어 적당한 폴리아크릴산, 폴리말레산 및 폴리아크릴산/폴리말레산 공중합체 및 그것의 염을 포함한다.

식기 세척 세제 조성물은 염소/브롬-유형 또는 산소-유형의 표백제를 함유할 수 있다.

무기 염소/브롬-유형 표백제의 예는 염소화된 삼인산나트륨 뿐만 아니라 리튬, 나트륨 또는 칼슘 하이포클로리트 및 하이포브로미트이다. 유기 염소/브롬-유형 표백제의 예는 트리클로로이소시아누르산, 트리브로모이소시아누르산, 디브로모이소시아누르산, 및 디클로로이소시아누르산, 및 칼륨과 나트륨 같은 수용성 양이온과의 그것의 염이다.

산소 표백제는 예를들어 표백 전구물질 또는 퍼옥시산 화합물과의 무기과염의 형태인 것이 바람직하다. 적당한 퍼옥시 표백 화합물의 전형적인 예는 알칼리금속 과붕산염, 4 수화물 및 일 수화물 둘다, 알칼리 금속 과탄산염, 과규산염 및 과인산염이다.

바람직한 활성제의 재료는 TAED와 글리세롤 트리아세테이트이다.

본 발명의 식기 세척 세제 조성물은 효소를 위한 종래의 안정화제, 예를들어 프로필렌 글리콜 같은 폴리올, 당 또는 당알코올, 락트산, 붕산 또는 방향족 붕산 에스테르 같은 붕산 유도체를 사용하여 안정화될 수 있다.

또한 식기 세척 세제 조성물은 다른 효소, 보다 구체적으로 아밀라제, 프로테아제 및/또는 셀룰라제로 이루어질 수 있다.

또한 본 발명의 식기 세척 세제 조성물은 다른 종래의 세제 성분, 예를들어 해교제 (解膠劑), 충전제, 거품억제제, 부패방지제, 흙현탁제, 격리제, 흙 재침전방지제, 탈수제, 염료, 살균제, 형광제, 농화제 및 향료를 함유할 수 있다.

최종적으로, 본 발명의 변이체는 종래의 식기세척세제, 예를들어 다음의 특허 공개 공보중의 어떤 것에 기술된 세제의 어떤 것에도 사용될 수 있다:

EP 551670, EP 533239, WO 9303129, EP 507404, US 5141664, GB 2247025, EP 414285, GB 2234980, EP 408278, GB 2228945, GB 2228944, EP 387063, EP 385521, EP 373851, EP 364260, EP 349314, EP 331370, EP 318279, EP 318204, GB 2204319, EP 266904, US 5213706, EP 530870, CA 2006687, EP 481547, EP 337760, WO 93/14183, US 5223179, WO 93/06202, WO 93/05132, WO 92/19707, WO 92/09680, WO 92/08777, WO 92/06161, WO 92/06157, WO 92/06156, WO 91/13959, EP 399752, US 4941988, US 4908148.

- 2) 겹 필터에 있는 모리파제 유전자 또는 돌연변이된 리파제 유전자를 함유하는 효모 세포를 편평하게 하고 30℃에서 2일이나 3일동안 배양한다.
- 3) 상부 필터를 새 플레이트로 운반함으로써 상부 필터에 콜로니를 유지시킨다.
- 4) 단백질 결합 필터를 빈 페트리 접시로 옮긴다.
- 5) 청색-녹색 반점의 형태로 리파제 활성을 발현하는 콜로니를 확인하기 위해 하부 필터에 올리브 오일 에멀션(2% P.V.A. : 올리브 오일 = 3 : 1), Brilliant green (지시약, 0.004%), 100mM 트리스 완충액 pH 9 및 EGTA(최종농도 5mM)로 이루어지는 아가로스 용액을 붓는다.
- 6) 모 리파제와 비교하여 칼슘에 대해 감소된 의존성을 갖는 단계 5)에서 발견된 콜로니를 확인한다.

DobanolTM25-7 필터 분석법:

세제 성분에 대해 개선된 내성을 위한 스크리닝은 단계 5)에서 정의된 용액이 0.02% DobanolTM25-7로 더 이루어지는 사실을 제외하고는 상기 기술된 바와 대응하는 필터 분석법을 사용하여 실행된다.

임의적 돌연변이유발된 라이브러리의 구조물

a) 전체 리파제 암호 유전자 사용

플라스미드 pYESHL을 실온에서 20분동안 12M 포름산으로 처리한다.

결과 리파제 암호 유전자는 돌연변이의 조건(0.5mM MnCl₂ 및 ATP의 정상량의 1/5, 예를들어 Leung et al., 1989. 참조)하에서 PCR을 사용하여 포름산 처리된 플라스미드로부터 증폭된다.

이 처리는 포름산이 주로 변위를 하게 하고 PCR 발생 돌연변이가 주로 전이하기 때문에 광범위한 돌연변이가 일어날 것으로 예상된다.

결과된 PCR 단편은 생체내에서 서플 벡터에 이중의 재조합(Muhlrads et al., 1992) 또는 서플 벡터에 분해 및 연결과 E. coli의 형질전환에 의해 클론화된다.

8개의 임의로 고른 클론을 서열화시키고 변위 및 전이 둘다 평균 2-3개의 돌연변이를 함유하는 것이 확인되었다.

이 방법을 사용하여 7개의 라이브러리는 10,000-140,000 클론을 함유하게 제조되었다.

b) 국소화된 임의적 돌연변이유발 실험

돌연변이유발개시제(올리고뉴클레오타이드)는 돌연변이유발될 아미노산 코돈에 대응하는 뉴클레오타이드(들)를 제외한 돌연변이유발될 DNA 서열의 부분에 대응하여 합성된다.

따라서, 결과된 돌연변이유발개시제는 적당한 반대 개시제와 PCR 반응에 사용된다. 결과된 PCR 단편을 정제하고 분해하고 서플 벡터로 클론화시킨다. 대안으로 필요하다면 결과된 PCR 단편을 개시제로서 두번째 적당한 개시제와 두번째 PCR 반응에 사용하여 서플 벡터에 돌연변이유발된 부위의 분해 및 클로닝을 허용하도록 한다.

DNA 서열화는 ABI Dye Terminator Cycle Sequencing 키트 프로토콜에 따라 적용된 바이오시스템 ABI DNA 서열 모델 373A를 사용함으로써 실행하였다.

실시예

실시예 1

임의적 리파제 변이체의 구성

전체 *H. lanuginosa* 리파제 유전자 및 그것의 아미노산(aa) 91-97 및 206-211의 임의적 돌연변이유발된 라이브러리를 상기의 재료 및 방법에서 기술된 바와 같이 제조하였다.

아미노산 부위 91-97 및 206-211이 세척성능에 중요한 것으로 밝혀졌기 때문에 국소화된 돌연변이유발을 위해 선택하였다. 부위 91-97은 리파제의 리드 부위의 부분이고 부위 206-211은 리파제의 소수 갈라진 틈의 부분을 차지한다.

aa 91-97 라이브러리(리드부위)로부터 양성의 저칼슘 25와 전체 유전자 라이브러리로 부터 양성의 Dobanol™ 25-7 12를 분리시켰다. aa 91-97의 돌연변이유발로부터 양성의 저칼슘의 14를 서열화하였다.

돌연변이유발된 부위 밖의 3개의 다른 돌연변이(코돈 83, 103, 145)를 PCR 잘못 합체 됨에 의해 설명할 수 있지만, S83T의 돌연변이는 PCR 잘못 합체됨과 상당히 다른 변위 이다.

서열

5'	5	C	G
T	5	C	3'
T	7	A	
A	8	G	<u>병 5:</u> 93% A; 2.33% C; 2.33% G and 2.33% T
T	8	T	
T	A/C	T	
T	5	C	
C	7	T	
T	5	C	<u>병 6:</u> 93% C; 2.33% A; 2.33% G and 2.33% T
T	8	T	
T	8	A	
6	C/G	T	
5	6	G	<u>병 7:</u> 93% G; 2.33% A; 2.33% C and 2.33% T
5	6	G	
7	G	A	
8	A	A	
6	T	C	<u>병 8:</u> 93% T; 2.33% A; 2.33% C and 2.33% G
7			

표 1: 리플라제®의 아미노산 91-97의 국소화된 임의적 돌연변이에 사용된 올리고뉴클레

오티드의 구조물의 예시:

서열에 있는 숫자는 병에 관련되며 이 조성물은 올바른 서열을 나타낸다.

표 2

균주번호	변이체유형				
59	I		G91A	N94K	D96A
60	II	S83T		N94K	D96N
61	II	S83T		N94K	D96N
62	III		E87K		D96V
63	IV		E87K	G91A	D96V
64	II	S83T		N94K	D96N
65	III		E87K		D96V
67	V			N94K	F95L
69	V			N94K	F95L
71	III		E87K		D96V
72	II	S83T		N94K	D96N

표 2: 균주번호는 Aspergillus 발현벡터 pAHL로 클론화되어 최초로 고른 클론과 관련

변이체 유형은 임의적 돌연변이유발 라이브러리의 증폭 동안에 발생할 수 있는 동일한 클론과 관련.

변이체 유형 I 및 II는 0.01% Dobanol™ 25-7에 활성인 반면에 나머지는 야생형 같이 불활성이다.

표 3

균주번호	변이체유형	DNA 서열 (상기 서열의 아미노산 번호)										
		82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92
		GGC	TCT	CGT	TCC	ATA	GAG	AAC	TGG	ATC	GGG	AAT
59	I											
60	II											
61	II		A								C	
62	III		A								C	
63	IV						A				C	
64	II						A				C	
65	III		A								C	
67	V						A				C	
52/68	wt										C	
53	wt										C	
69	V											
71	III										C	
72	II						A				C	
73	VI		A								C	

야생형		93	94	95	96	97	98	99	100	-103	-145
		CTT	AAC	TTC	GAC	TTG	AAA	GAA	ATA	-ATT	-CAT
59	I	G	G		C						
60	II	G	G		A						
61	II	G	G		A						
62	III				T						
63	IV				C					C	C
64	II	G	G		A						
65	III	G			T						
67	V		A	C	A	C					
52/68	wt										
53	wt										
69	V		A	C	A	C					
71	III	G			T						
72	II	G	A		A						
73	VI				A	?					

표 3: 야생형 서열을 제일상단에 나타낸다.

야생형과 다른 뉴클레오티드만 변이체 서열에 기록한다.

코돈 91과 93의 염기를 각각 1:1의 C/T 및 T/G로 도핑시켰다.

반면에 코돈 91-97에서의 뉴클레오티드를 93%의 야생형 및 2.33%의 3개의

다른 뉴클레오티드를 사용하여 도핑시켰다.

실시에 2

실시에 1에 기술된 방법과 유사하게, 다음의 변이체는 임의적 돌연변이유발로 구성되었다. 또한 변이체의 어떤 것을 선택하기 위해 사용된 실질적인 스크리닝 기준을 기술한다.

D167G+E210V

5mM EGTA, 0.01% Dobanol™25-7, 0.006% LAS
E87K+G91A+L93I+N94K+D96A

5mM EGTA, 0.02% Dobanol™25-7
N73D+S85T+E87K+G91A+N94K+D96A
S83T+E87K+W89G+G91A+N94K+D96V
E87K+G91A+D96R+I100V
S83T+E87K+Q249R
E87K+G91A

실시예 3

Aspergillus oryzae에서 Humicola lanuginosa 리파제의 발현

Humicola lanuginosa 리파제의 클로닝은 EP 305216에 기술된다. 또한 Aspergillus oryzae에서 리파제의 발현 및 특성을 기술한다. 사용된 발현 플라스미드는 p960으로 명명된다.

본 출원에 사용된 발현 플라스미드는 p960과 동일하지만, 리파제의 암호부위에 대해 부변형 3'만 제외시킨다. 변형을 다음의 방법으로 만들었다: p960을 NruI 및 BamHI 제한효소로 분해시켰다. 이들 2개의 부위 사이에서 플라스미드 pBR322로부터 BamHI/NheI 단편을 (여기서 NheI 단편을 Klenow 폴리머라제로 채운다) 클로닝화시키고 그것에 의해 유일한 BamHI 및 NheI 부위를 함유하는 플라스미드 pA01을 만들었다 (제2도). 이들 유일한 부위 사이에서 p960으로부터 BamHI/XbaI 단편을 클로닝화하여 pAHL을 얻었다 (제3도).

시험관내에서 부위지정된 리파제 유전자의 돌연변이 유발

리파제 유전자를 돌연변이를 도입하는데 사용된 접근은 Nelson 및 Long, Analytical Biochemistry (180, 147-151(1989)에 기술된다. 이것은 PCR-반응에서 개시제중의 하나로 화학적으로 합성된 DNA-가닥을 사용함으로써 도입된 원하는 돌연변이를 함유하는 PCR (폴리머라제 연쇄반응) 단편의 3단계-발생을 포함한다. PCR발생 단편으로부터, 돌연변이를 수반하는 DNA 단편을 제한효소로 절단하여 분리시키고 발현 플라스미드로 재-삽입시킬 수 있다. 이 방법은 실시예 5에서 충분히 기술된다. 제4도 및 5도에서 방법은 더 설명된다.

Humicola lanuginosa 리파제의 N94K/D96A 유사체를 발현하는 플라스미드의 구조물

플라스미드 pAHL의 선형화

원형 플라스미드 pAHL을 다음의 50 μ l 반응혼합물중의 제한효소 SphI로 선형화시킨

다: 50mM NaCl, 10mM 트리스-HCl, pH 7.9, 10mM MgCl₂, 1mM 디티오프레이톨, 1μg 플라스미드 및 SphI의 2단위. 분해를 37℃에서 2시간 동안 실행시킨다. 반응 혼합물을 페놀로 추출하고 (트리스-HCl로 평형이 되게함, pH 7.5) 빙냉 96%의 에탄올의 2부피를 가하여 침전시킨다. 원심분리 및 펠렛의 건조후에, 선형화된 DNA를 50μl H₂O에 용해시키고 농도는 아가로스겔로 측정하였다.

3-단계 PCR 돌연변이 유발

제5도에 나타낸 바와 같이, 3-단계 돌연변이 유발은 4개의 개시제의 사용을 포함한다.

돌연변이유발 개시제 (=A) : 5'-TATTTCTTTCAAAGCGAAGCTTAAGATTC-
CCGAT-3'

PCR 조제 1 (=B) : 5'-GGTCATCCAGTCACTGAGACCCTCTACCTATTAA-
ATCGGC-3'

PCR 조제 2 (=C) : 5'-CCATGGCTTTTCACGGTGTCT-3'

PCR 처리제 (=D) : 5'-GGTCATCCAGTCACTGAGAC-3'

조제 1 및 조제 2는 암호부위 밖의 서열을 보충하고, 따라서 변이체 서열의 구조물에
서 어떤 돌연변이유발 개시제와 조합하여 사용할 수 있다.

모든 3단계를 다음을 함유하는 완충액에서 실행시킨다: 10mM 트리스-HCl, pH 8.3, 50
mM KCl, 1.5mM MgCl₂, 0.001% 젤라틴, 0.2mM dATP, 0.2mM dCTP, 0.2mM dGTP,
0.2mM TTP, 2.5 단위의 타크(Taq) 폴리머라제.

단계 1에서, 100pmol 개시제 A, 100pmol 개시제 B 및 1fmol 선형 플라스미드를 전체
100μl 반응혼합물에 가하고 95℃에서 2분, 37℃에서 2분 및 72℃에서 3분으로 이루어지
는 15사이클을 실행시킨다.

PCR 생성물의 농도는 아가로스겔로 측정한다. 다음에, 단계 2를 실행시킨다.

0.6pmol 단계 1의 생성물 및 1 fmol 선형 플라스미드를 전체 100μl의 상기 언급한 완충

액에 함유시키고 95℃에서 5분, 37℃에서 2분 및 72℃에서 10분으로 이루어지는 1사이클을 실행한다.

단계 2의 반응혼합물에, 100pmol 개시제 C와 100pmol 개시제 D를 첨가하고 (각각 1μl 씩), 95℃에서 2분, 37℃에서 2분 및 72℃에서 3분으로 이루어지는 20사이클을 실행한다. 이 조작은 돌연변이유발 방법 중의 단계 3으로 이루어졌다.

돌연변이된 제한 단편의 분리

단계 3의 생성물을 아가로스겔로부터 분리시키고 20μl H₂O에 재용해시킨다. 다음에, 전체부피 50μl의 다음 조성물중의 제한효소 BamHI 및 BstXI로 분해시킨다: 100mM NaCl, 50mM 트리스-HCl, pH 7.9, 10mM MgCl₂, 1mM DTT, 10단위의 BamHI 및 10단위의 BstXI. 배양은 2시간 동안 37℃에서 한다. 733bp BamHI/BstXI 단편을 아가로스겔로부터 분리시킨다.

발현벡터 pAHL의 연결

발현 플라스미드 pAHL을 상기 지정된 조건하에서 BamHI 및 BstXI로 절단하고 큰 단편을 아가로스겔로부터 분리시킨다. 이 벡터에, 상기 분리시킨 돌연변이 단편을 연결시키고 연결 혼합물을 *E. coli*로 형질전환하기 위해 사용한다. 단편의 존재 및 배향은 제한효소와의 형질전환체로부터 플라스미드 제조물의 절단으로 입증된다. 서열 분석을 ABI 서열기, 모델 373A에서 DyeDeoxy™ Terminator Cycle Sequencing 키트 (응용된 바이오시스템)를 사용하여 겹-가닥의 플라스미드에서 실행한다. 플라스미드를 pAHLG91A/N94K/D96A로 명명하고, pAHL과 동일하지만 치환된 코돈은 제외시킨다.

실시예 4

Humicola 리파제의 다른 변이체를 발현시키는 플라스미드의 구조물

다음의 변이체는 실시예 3에서 기술된 동일한 방법을 사용하여 구성된다. 플라스미드 이름과 변형에 사용된 개시제는 하기에서 열거된다.

플라스미드 이름

개시체 A의 서열

PAHLS83T/N94K/D96A	5'-ATTTCTTTCAAAGCGAACTTAAGATTCCCGA-TCCAGTTCTCTATGGAACGAGTGCCACGGAAAGA-3'
PAHLE87K/D96V	5-TATTTCTTTCAAACGAAGTTAAGATTCCCGATCC-AGTTCTTTATGGAACGAGA-3'
PAHLE87K/G91A/D96A	5'-TATTTCTTTCAAAGCGAAGTTAAGATTAGCGATC-CAGTTCTTTATGGAACGAGA-3'
PAHLN94K/F95L/D96H	5'-TATTTCTTTCAAGTGCAACTTAAGATTCCCGAT-3'
PAHLF95C/D96N	5'-TATTTCTTTCAAGTTACAGTTAAGATTCCC-3'
PAHLG91S/L93V/F95C	5'-TATTTCTTTCAAGTCACAGTTAACATTAGAGATCC-AGTTCTC-3'
PAHLE87K/G91A/L93I/N94K/D96A	5'-TATTTCTTTCAAAGCGAACTTAATATTAGCGATC-CAGTTCTTTATGGAACGAGA-3'
PAHLD167G	5'-ATATGAAAACACACCGATATCATACCC-3'
PAHLA121V	5'-CCTTAACGTATCAACTACAGACCTCCA-3'
PAHLR205K/E210Q	5'-GCTGTAACCGAATTGGCGCGGCGGGAGCTTAGGG-ACAATATC-3'
PAHLN73D/S85T/E87K/G91A/N94K/D96A	5'-TATTTCTTTCAAAGCGAACTTAAGATTAGCGATC-CAGTTCTTTATAGTACGAGAGCCACGGAA-AGAGAGGACGATCAATTTGTCCGTGTTGTCGAG-3'
PAHLS83T/E87K/W89G/G91A/N94K/D96V	5'-TATTTCTTTCAAACGAAGTTAAGATTAGCGATA-CCGTTCTTTATGGAACGAGTGCCACGGAAAGA-3'
PAHLE87K/G91A/D96R/I100V	5'-GCAAATGTCATTAACCTTCTTTCAATCTGAAGTTAA-GATTAGCGATCCAGTTCTTTATGGAACGAGA-3'
PAHLS83T/E87K	5'-CCCGATCCAGTTCTTTATGGAACGAGTGCCACGG-AAAGA-3'
PAHLE87K/G91A	5'-GAAGTTAAGATTAGCGATCCAGTTCTTTATGGAA-CGAGA-3'
PAHLS83T/E87K	5'-CCCGATCCAGTTCTTTATGGAACGAGTGCCACGG-AAAGA-3'
PAHLQ249R	5'-CGGAATGTTAGGTCTGTTATTGCCGCC-3'

실시예 5

Humicola 리파제의 조합 유사체를 발현시키는 플라스미드의 구조물

플라스미드 pAHL167G/E210V
pAHLA121V/R205K/E210Q
및 pAHL583T/E87K/Q249R

은 적당한 개시제를 사용하여 2개의 연속적인 돌연변이유발 단계를 실행함으로써 구성된다.

실시예 6

Aspergillus 중의 리파제 유사체의 발현

Aspergillus oryzae의 형질전환 (일반 방법)

100ml의 YPD (Sherman et al., Yeast Genetics의 방법, Cold Spring Harbor Laboratory, 1981)를 *A. oryzae*의 포자로 접종시키고 약 24시간 동안 흔들어주면서 배양한다. 균사를 미라클로드(miracloth)를 통한 여과로 얻고 200ml의 0.6M $MgSO_4$ 로 세척한다. 균사를 15ml의 1.2M $MgSO_4$, 10mM NaH_2PO_4 , pH = 5.8에서 현탁시킨다. 현탁액을 얼음에서 냉각시키고 120mg의 Novozym 234, batch 1687을 함유하는 1ml의 완충액을 첨가한다. 5분후에, 1ml의 12mg/ml BSA (시그마유형 H25)를 첨가하고 샘플을 현미경하에서 관찰할 때 많은 원형질체가 보일때까지 37°C에서 1.5-2.5시간 동안 계속하여 온화하게 휘저어 배양을 한다.

현탁액을 미라클로드를 통하여 여과시키고 여과액을 살균 튜브에 옮기고 5ml의 0.6M 소르비톨, 100mM 트리스-HCl (pH = 7.0)을 넣었다. 원심분리는 1000g에서 15분 동안 실행시키고 원형질체를 $MgSO_4$ 완충물의 윗부분으로부터 수집한다. 2부피의 STC (1.2M 소르비톨, 10mM 트리스-HCl, pH = 7.5, 10mM $CaCl_2$)를 원형질체의 현탁액에 가하고 혼합물을 1000g에서 5분 동안 원심분리시킨다. 원형질체 펠렛을 3ml의 STC에 재현탁시키고 재펠렛시킨다. 이 조작을 반복한다. 최종적으로 원형질체를 0.2-1ml의 STC에 재현탁시킨다.

100 μ l의 원형질체 현탁액을 100 μ l의 STC중의 5-25 μ g의 p3SR2 Hynes et al., Mol. 및

Cel. Biol. Vol. 3, No. 8, 1430-1439, 1983년 8월에 기술된 플라스미드를 수반하는 *A. nidulans* amdS 유전자) 혼합액을 실온에서 25분 동안 방치한다. 0.2ml의 60% PEG 4000 (BDH 29576), 10mM CaCl₂ 및 10mM 트리스-HCl (pH = 7.5)을 가하고 조심스럽게 혼합하고 (2번), 최종적으로 0.85ml의 동일한 용액을 첨가하고 조심스럽게 혼합시킨다. 혼합액을 실온에서 25분 동안 방치하고, 2.500g에서 15분 동안 회전시키고 펠렛을 2ml의 1.2M 소르비톨에 재현탁시킨다. 약간의 침전 후에 원형질체를 1.0M 자당, pH = 7.0, 질소 원천으로서의 10mM의 아세트아미드 및 배경성장을 억제하기 위한 20mM의 CsCl을 함유하는 최소의 플레이트에 편평하게 펼친다(Cove, Biochem. Biophys. Acta 113 (1966) 51-56). 4-7일 동안 37°C에서 배양한 후에 포자를 고르고, 살균수에 현탁시키고 단일 콜로니를 편평하게 한다. 이 방법을 반복하고 두번째의 재분리 이후에 단일 콜로니의 포자를 한정된 형질전환체로서 저장한다.

A. oryzae 중의 리파제 유사체의 발현

상기한 플라스미드를 상기 실시예에 기술된 바와 같이 *A. nidulans*로부터 amdS 유전자를 함유하는 p3SR2와의 형질전환에 의한 *A. oryzae* IFO 4177로 형질전환시킨다. 상기한 바와 같이 제조된 원형질체를 동등한 양의 발현 플라스미드와 p3SR2의 혼합물로 배양시키고, 약 5μg의 각각을 사용한다. 단독의 질소 원천으로 아세트아미드를 사용할 수 있는 형질전환체를 2번 재분리시킨다. 3일 동안 YPD에서 성장시킨 후에 배양 상청액을 리파제 활성에 대한 분석법을 사용하여 분석한다. 좀더 연구하기 위해 가장 좋은 형질전환체를 선택하고 30°C에서 4일 동안 200ml FG4 배지(3% 콩가루, 3% 말토덱스트린, 1% 펩톤, 4M NaOH로 7.0으로 조정된 pH)로 1L 교반-플라스크에서 성장시킨다.

실시예 7

본 발명의 리파제 변이체의 발현

리파제 활성에 대한 분석:

리파제에 대한 기질을 유화제로 아라비아 고무를 사용하여 트리부티르산글리세란(MERCK)을 유화시킴으로써 제조하였다.

리파제 활성을 pH 정역학 방법을 사용하여 pH 7에서 분석하였다. 리파제 활성의 단위(LU/mg)를 분당 1 μ M 지방산을 유리시키기 위해 필요한 양으로서 정의하였다.

단계 1: 발효 상청액을 원심분리하고, 침전물은 버린다. 상청액의 pH를 7로 조정하고 같은 부피의 냉 96% 에탄올을 조금씩 가한다. 혼합물을 얼음욕에서 30분 동안 유지시키게 한다. 원심분리하고 침전물을 버린다.

단계 2: -이온 교환 크로마토그래피. 상청액을 여과하고 50mM 트리스-아세테이트 완충액(pH7)으로 평형을 이룬 DEAE-고속흐름(조제 TM) 관에 적용한다. 관을 같은 완충액으로 세척하고 280nm에서 흡수가 될 때까지 0.05OD 보다 더 낮게한다. 5개의 관 부피를 사용하여 같은 완충액중의 선형 염구배(0-0.5M NaCl)로 묶인 효소활성을 용리한다. 효소활성을 함유하는 단편을 모은다.

단계 3: -소수 크로마토그래피. 효소활성을 함유하는 푸울의 물농도를 고체 암모늄 아세테이트를 가함으로써 0.8M로 조정한다. 효소를 0.8M 암모늄 아세테이트로 미리 평형을 이룬 TSK 겔 Butyl-Toyopearl 650C 란(Tosoh Corporation Japan에서 구입)에 적용한다. 0.8M 암모늄 아세테이트로 풀린 물질을 세척하고 증류수로 묶인 물질을 용리한다.

단계 4: -리파제 활성을 함유하는 푸울을 콘덕턴스를 2ms에 조정하기 위해 물로 증류한다. 푸울을 50mM 트리스-아세테이트 완충액(pH7)으로 미리 평형을 이룬 고성능 Q 세파로스 (조제)관에 적용한다. 선형 염구배로 묶인 효소를 용리한다.

실시예 8

본 발명의 리파제의 변이체의 세척성능

본 발명의 *Humicola lanuginosa* 리파제 변이체의 세척성능을 야생형 *H. lanuginosa* 리파제와 비교하여 OD₂₈₀에 따른 리터당 단백질(mg)의 효소 사용량의 기제에서 평가하였다.

세척시험을 항온의 물욕에 놓인 150ml의 비이커에서 실행하였다. 비이커를 3각형의 자석 막대기로 교반시켰다.

실험조건은 다음과 같았다:

방법: 각 사이클 사이에 하룻밤 건조시키는 3사이클

세척액: 비이커당 100ml

건본: 비이커당 6개의 건본(3.5×3.5cm)

섬유: 100% 면, 시험섬유 모양 #400

얼룩: Sudan red로 염색된 라드(라드의 0.75mg 염료/g). 70℃로 가열된 6μl의 라드를 각 건본의 중앙에 적용시켰다. 얼룩의 적용 후에, 건본을 오븐에서 75℃에서 30분 동안 가열하였다. 다음에 건본을 첫번째 세척을 하기 전에 실온에서 하룻밤 보관하였다.

세제: LAS (Nansa 1169/P, 30% a.m.)	1.17g/ℓ
AEO (Dobanol™ 25-7)	0.15g/ℓ
3인산나트륨	1.25g/ℓ
황산나트륨	1.00g/ℓ
탄산나트륨	0.45g/ℓ
규산나트륨	0.15g/ℓ

pH: 10.2

리파제농도: 리터당 리파제 단백질의 0.075, 0.188, 0.375, 0.75 및 2.5mg

시간: 20분

온도: 30℃

행구기: 흐르는 물에서 15분

건조: 실온에서 하룻밤(∼20℃, 30-50% RH)

평가: 3번째 세척후, 460nm에서 반사율을 측정하였다.

결과

사용량-반응곡선을 리파제 변이체와 원래의 *H. lanuginosa* 리파제를 비교하였다.

사용량-반응곡선을 다음 식의 측정된 데이터로 정함으로써 계산하였다.

$$\Delta R = \Delta R_{\text{최대}} \frac{C^{0.5}}{K + C^{0.5}} \quad (\text{I})$$

여기서 ΔR 은 반사율 단위에서 나타난 효과

C 는 효소농도(mg/ℓ)

$\Delta R_{\text{최대}}$ 은 최대효과를 나타내는 상수

K 는 상수; K^2 는 최대효과의 절반을 얻은 효소농도를 나타낸다.

야생형 리파제 뿐만아니라 특성 상수 $\Delta R_{\text{최대}}$ 및 각 리파제 변이체를 위해 밝혀진 K 에 근거하여 개선인자를 계산하였다. 다음과 같이 정의된 개선인자는

$$f_{\text{개선}} = C_{\text{WT}}/C \quad (\text{II})$$

0.25mg/ℓ의 관련 야생형 단백질(C_{WT})로 얻은 것과 같은 동등 효과를 얻기 위해 필요한 리파제 변이체 단백질의 양을 나타낸다. 따라서, 개선인자를 계산하는 방법을 다음과 같이 하였다.

1) 0.25mg/ℓ에서 야생형 단백질의 효과($\Delta R_{\text{야생형}}$)를 식 (I)을 사용하여 계산하였다.

2) 0.25mg/ℓ에서 야생형과 같은 동등효과를 초래하는 리파제 변이체의 농도를 다음 식을 사용하여 계산하였다.

$$C = \left(K_{\text{(유사제)}} \frac{\Delta R_{\text{최대(야생형)}}}{\Delta R_{\text{최대(야생형)}} - \Delta R_{\text{(야생형)}}} \right)^2 \quad (\text{III})$$

3) 개선인자를 식 (II)를 사용하여 계산하였다.

결과는 다음의 표 1에 나타낸다.

표 1

변이체	개선인자
E87K+D96V	1.2
S83T+N94K+D96N	2.3
N94K+D96A	2.7
E87K+G91A+D96A	2.6
N94K+F95L+D96H	3.3
D167G+E210V	5.0
E87K+G91A+L93I+N94K+D96A	1.3
E87K+G91A+D96R+I100V	5.2
E87K+G91A	5.0
N73D+E87K+G91A+N94I+D96G	1.3
S83T+E87K+G91A+N92H+N94K+D96M	3.8
K46R+E56R+G61S	1.9
D102K	0.2
D167G	1
N73D+E87K+G91A+N94I+D96G	1.3
E210R	2.7
E210K	5.5
E210W	1
N251W+D254W+T267W	0.8
S83T+E87K+G91A+N92H+N94K+D96M	3.8
E56R+I90F+D96L+E99K	4.8
D57G+N94K+D96L+L97M	1.9

본 명세서에 인용된 참조문헌

Muhlrad et al., 1992, Yeast, Vol. 8, 79-82

Shimada, Y. et al. (1989). cDNA Molecular Cloning of *Geotrichum candidum* Lipase. J. Biochem., 106, 383-388.

Yamaguchi, S. et al. (1991). Cloning and structure of the mono- and diglycerol lipase-encoding gene from *Penicillium camembertii* U-150. Gene 103, 61-67.

Hass, M.J. et al. (1991). Cloning, expression and characterization of a cDNA encoding a lipase from *Rhizopus delemar*. Gene 109, 107-113.

Kugimiya, W. et al. (1992). Cloning and Sequences Analysis of DNA encoding *Rhizopus niveus* Lipase. Biosci. Boitech. Biochem. 56, 716-719.

Dartois, V. et al. (1993). Cloning, nucleotide sequence and expression in *Escherichia coli* of a lipase gene from *Bacillus subtilis* 168. Biochemica et Biophysica acta 1131, 253-260.

Sambrook et al. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Ed., Cold Spring Harbor, 1989.

R.K. Saiki et al., Science 239, pp. 487-491, 1988.

Beaucage and Caruthers, Tetrahedron Letters 22, pp. 1859-1869, 1981.

Matthes et al., The EMBO J. 3, pp. 801-805, 1984.

J.O. Deshler, (1992) A simple method for randomly mutating cloned DNA fragments by using chemical mutagens and the polymerase chain reaction. GATA 9(4): 103-106

Leung et al., Technique, Vol. 1, No. 1, pp. 11-15, 1989

Fowler et al., Molec. gen. Genet., 133, pp. 179-191, 1974.

Brady et al., "A Serine Protease Triad Forms the Catalytic Centre of a Triacylglycerol Lipase", Nature 343, 1990, pp. 767-770, 1990.

Tilbeyrgh, H. van, Egloff, M.-P., Martinez, C., Rugani, N., Verger, R. and Cambillau (1993) Nature 362, p. 814-820. Interfacial activation of the lipase-prolipase complex by mixed micelles revealed by X-ray crystallography.

Hudson et al., Practical Immunology, Third edition, Blackwell Scientific Publications, 1989

Alber, T. and Kawasaki, G., J.Mol.Appl. Genet 1, 419-434 (1982)

서 열 목 록

(1) 일반정보

- (i) 출원인: 노보 노르디스크 A/S
- (ii) 본발명의 제목: 지질분해효소의 변이체를 제조하는 방법
- (iii) 서열의 번호: 2
- (iv) 서신주소:
 - (A) 수신인: 노보 노르디스크 A/S
 - (B) 거리: 노보 알레
 - (C) 도시: 바그스벨트
 - (E) 나라: 덴마크
 - (F) 우편번호: 2880
- (v) 컴퓨터 판독가능한 형태:
 - (A) 매체 종류: Floppy disk
 - (B) 컴퓨터: IBM PC 호환성
 - (C) 작동시스템: PC-DOS/ MS-DOS
 - (D) 소프트웨어: PatentIn Release # 1.0, Version # 1.25
- (vi) 대리인/대행자 정보:
 - (A) 이름: 쇠래젠, 리즈 아빌트가르트
 - (C) 참고/소송사건일람 번호: 4153.204-WO
- (ix) 원거리통신 정보:
 - (A) 전화: +45 4444 8888
 - (B) 전화전송: +45 4449 3256
 - (C) 텔렉스: 37304

(2) SEQ ID-NO: 1에 대한 정보

- (i) 서열 특성:
 - (A) 길이: 918 염기쌍
 - (B) 유형: 핵산
 - (C) 가닥형태: 단일형
 - (D) 위상: 선형
- (ii) 분자유형: cDNA
- (vi) 원천:
 - (A) 유기체: *Humicola lanuginosa*
- (ix) 특징:
 - (A) 이름/키: CDS
 - (B) 위치: 1..873
 - (C) 이름/키: mat_펩티드
 - (D) 위치: 67..873
- (xi) 서열기술: SEQ ID NO:1:

ATG AGG AGC TCC CTT GTG CTG TTC TTT GTC TCT GCG TGG ACG GCC TTG 48
 Met Arg Ser Ser Leu Val Leu Phe Phe Val Ser Ala Trp Thr Ala Leu
 -20 -15 -10

GCC AGT CCT ATT CGT CGA GAG GTC TCG CAG GAT CTG TTT AAC CAG TTC 96
 Ala Ser Pro Ile Arg Arg Glu Val Ser Gln Asp Leu Phe Asn Gln Phe
 -5 1 5 10

AAT CTC TTT GCA CAG TAT TCT GCA GCC GCA TAC TGC GGA AAA AAC AAT 144
 Asn Leu Phe Ala Gln Tyr Ser Ala Ala Tyr Cys Gly Lys Asn Asn
 15 20 25

GAT GCC CCA GCT GGT ACA AAC ATT ACG TGC ACG GGA AAT GCC TGC CCC 192
 Asp Ala Pro Ala Gly Thr Asn Ile Thr Cys Thr Gly Asn Ala Cys Pro
 30 35 40

GAG GTA GAG AAG GCG GAT GCA ACG TTT CTC TAC TCG TTT GAA GAC TCT 240
 Glu Val Glu Lys Ala Asp Ala Thr Phe Leu Tyr Ser Phe Glu Asp Ser
 45 50 55

GGA GTG GGC GAT GTC ACC GGC TTC CTT GCT CTC GAC AAC ACG AAC AAA 288
 Gly Val Gly Asp Val Thr Gly Phe Leu Ala Leu Asp Asn Thr Asn Lys
 60 65 70

TTG ATC GTC CTC TCT TTC CGT GGC TCT CGT TCC ATA GAG AAC TGG ATC 336
 Leu Ile Val Leu Ser Phe Arg Gly Ser Arg Ile Glu Asn Trp Ile
 75 80 85 90

CGG AAT CTT AAC TTC GAC TTG AAA GAA ATA AAT GAC ATT TGC TCC GGC 384
 Gly Asn Leu Asn Phe Asp Leu Lys Glu Ile Asn Asp Ile Cys Ser Gly
 95 100 105

TGC ACG GGA CAT GAC GGC TTC ACT TCG TCC TGG AGG TCT GTA GCC GAT 432
 Cys Arg Gly His Asp Gly Phe Thr Ser Ser Trp Arg Ser Val Ala Asp
 110 115 120

ACG TTA AGG CAG AAG GTG GAG GAT GCT GTG AGG GAG CAT CCC GAC TAT 480
 Thr Leu Arg Gln Lys Val Glu Asp Ala Val Arg Glu His Pro Asp Tyr
 125 130 135

CGC GTG GTG TTT ACC GGA CAT AGC TTG GGT GGT GCA TTG GCA ACT GTT 528
 Arg Val Val Phe Thr Gly His Ser Leu Gly Gly Ala Leu Ala Thr Val
 140 145 150

GCC GGA GCA GAC CTG CGT GGA AAT GGG TAT GAT ATC GAC GTG TTT TCA 576
 Ala Gly Ala Asp Leu Arg Gly Asn Gly Tyr Asp Ile Asp Val Phe Ser
 155 160 165 170

TAT GGC GCC CCC CGA GTC GGA AAC AGG GCT TTT GCA GAA TTC CTG ACC 624
 Tyr Gly Ala Pro Arg Val Gly Asn Arg Ala Phe Ala Glu Phe Leu Thr
 175 180 185

GTA CAG ACC GGC GGA ACA CTC TAC CGC ATT ACC CAC ACC AAT GAT ATT 672
 Val Gln Thr Gly Gly Thr Leu Tyr Arg Ile Thr His Thr Asn Asp Ile
 190 195 200

GTC CCT AGA CTC CCG CCG CGC GAA TTC GGT TAC AGC CAT TCT AGC CCA 720
 Val Pro Leu Leu Pro Pro Arg Glu Phe Gly Tyr Ser His Ser Ser Pro
 205 210 215

GAG TAC TGG ATC AAA TCT GGA ACC CTT GTC CCC GTC ACC CGA AAC GAT 768
 Glu Tyr Trp Ile Lys Ser Gly Thr Leu Val Pro Val Thr Arg Asn Asp
 220 225 230

ATC GTG AAG ATA GAA GGC ATC GAT GCC ACC GGC GGC AAT AAC CAG CCT 816
 Ile Val Lys Ile Glu Gly Ile Asp Ala Thr Gly Gly Asn Asn Gln Pro
 235 240 245 250

AAC ATT CCG GAT ATC CCT GCG CAC CTA TGG TAC TTC GGG TTA ATT GGC 864

Asn Ile Pro Asp Ile Pro Ala His Leu Trp Tyr Phe Gly Leu Ile Gly
255 260 265

ACA TGT CTT TAGTGGCCGG CGCGGCTGGG TCCGACTCTA GCGAGCTCGA GATCT 918
Thr Cys Leu

(2) SEQ ID NO: 2에 대한 정보:

(i) 서열특성:

(A) 길이: 291 아미노산

(B) 유형: 아미노산

(D) 위상: 선형

(ii) 분자유형: 단백질

(xi) 서열기술: SEQ ID NO:2:

Met Arg Ser Ser Leu Val Leu Phe Phe Val Ser Ala Trp Thr Ala Leu
-20 -15 -10

Ala Ser Pro Ile Arg Arg Glu Val Ser Gln Asp Leu Phe Asn Gln Phe
-5 1 5 10

Asn Leu Phe Ala Gln Tyr Ser Ala Ala Ala Tyr Cys Gly Lys Asn Asn
15 20 25

Asp Ala Pro Ala Gly Thr Asn Ile Thr Cys Thr Gly Asn Ala Cys Pro
30 35 40

Glu Val Glu Lys Ala Asp Ala Thr Phe Leu Tyr Ser Phe Glu Asp Ser
45 50 55

Gly Val Gly Asp Val Thr Gly Phe Leu Ala Leu Asp Asn Thr Asn Lys
60 65 70

Leu Ile Val Leu Ser Phe Arg Gly Ser Arg Ser Ile Glu Asn Trp Ile
75 80 85 90

Gly Asn Leu Asn Phe Asp Leu Lys Glu Ile Asn Asp Ile Cys Ser Gly
95 100 105

Cys Arg Gly His Asp Gly Phe Thr Ser Ser Trp Arg Ser Val Ala Asp
110 115 120

Thr Leu Arg Gln Lys Val Glu Asp Ala Val Arg Glu His Pro Asp Tyr
125 130 135

Arg Val Val Phe Thr Gly His Ser Leu Gly Gly Ala Leu Ala Thr Val
140 145 150

Ala Gly Ala Asp Leu Arg Gly Asn Gly Tyr Asp Ile Asp Val Phe Ser
155 160 165 170

Tyr Gly Ala Pro Arg Val Gly Asn Arg Ala Phe Ala Glu Phe Leu Thr
175 180 185

Val Gln Thr Gly Gly Thr Leu Tyr Arg Ile Thr His Thr Asn Asp Ile
190 195 200

Val Pro Arg Leu Pro Pro Arg Glu Phe Gly Tyr Ser His Ser Ser Pro
205 210 215

Glu Tyr Trp Ile Lys Ser Gly Thr Leu Val Pro Val Thr Arg Asn Asp
220 225 230

Ile	Val	Lys	Ile	Glu	Gly	Ile	Asp	Ala	Thr	Gly	Gly	Asn	Asn	Gln	Pro
235					240					245					250
5	Asn	Ile	Pro	Asp	Ile	Pro	Ala	His	Leu	Trp	Tyr	Phe	Gly	Leu	Ile
				255						260					265
	Thr	Cys	Leu												

특허청구의 범위

1. (a) 모 지질분해효소를 암호화하는 DNA 서열을 임의적 돌연변이유발을 일으키게 하고,
(b) 숙주세포에서 단계 (a)에서 얻은 돌연변이된 DNA 서열을 발현시키고, 및
(c) 모 지질분해효소와 비교하여 칼슘에 대해 감소된 의존성 및/또는 세제나 세제 성분에 대해 개선된 내성을 갖는 돌연변이된 지질분해효소를 발현하는 숙주 세포를 스크리닝하는 것으로 이루어진 모 지질분해효소의 변이체를 제조하는 방법.
2. 제 1항에 있어서, 임의적 돌연변이유발은 물리적 또는 화학적 돌연변이유발제의 사용, 올리고뉴클레오타이드의 사용 또는 PCR 발생 돌연변이유발제의 사용에 의해 실행되는 것을 특징으로 하는 방법.
3. 제 2항에 있어서, 돌연변이유발제는 포름산, UV 조사, 히드록실아민, N-메틸-N'-니트로-N-니트로소구아니딘(MNNG), O-메틸히드록실아민, 아질산, 에틸메탄술포네이트(EMS), 중아황산나트륨, 및 뉴클레오타이드 유사체로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 방법.
4. 제 1항에 있어서, 돌연변이된 DNA 서열의 발현은 돌연변이된 DNA 서열의 발현을 허용하는 기능을 암호화하는 DNA 서열을 임의로 더 포함하는 돌연변이된 DNA 서열을 갖는 적당한 숙주세포를 형질전환하고 돌연변이된 DNA 서열을 발현하기 위해 적당한 조건하에서 단계(b)에서 얻은 숙주세포를 배양함으로써 실행되는 것을 특징으로 하는 방법.
5. 제 1항에 있어서, 돌연변이된 DNA 서열을 발현하는데 사용된 숙주세포가 미생물 세포인 것을 특징으로 하는 방법.

6. 제 5항에 있어서, 숙주세포가 균류 또는 박테리아 균주의 세포인 것을 특징으로 하는 방법.
7. 제 6항에 있어서, 숙주세포가 *A. niger*, *A. oryzae* 및 *A. nidulans* 같은 *Aspergillus* 속의 세포, 또는 *S. cerevisiae* 같은 *Saccharomyces* 속의 세포인 것을 특징으로 하는 방법.
8. 제 6항에 있어서, 숙주세포가 그람-양성의 박테리아의 균주의 세포, 예를들어,
Bacillus subtilis, *Bacillus licheniformis*,
Bacillus lentus, *Bacillus brevis*, *Bacillus stearothermophilus*,
Bacillus alkalophilus, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus coagulans*, *Bacillus circulans*, *Bacillus lautus*, *Bacillus thuringiensis* 또는 *Streptomyces lividans* 또는 *Streptomyces murinus*
같은 *Bacillus* 속의 세포, *E. coli* 같은 그람-음성의 박테리아 균주의 세포인 것을
특징으로 하는 방법.
9. 제 1항에 있어서, 돌연변이된 지질분해효소는 비이온성, 음이온성, 양이온성, 양성
이온성 또는 양쪽성의 계면활성제에 대한 개선된 내성을 갖는 것을 특징으로 하는
방법.
10. 제 9항에 있어서, 비이온성 계면활성제는 알코올 에톡실레이트 및/또는 음이온성
계면활성제는 LAS 또는 알킬술페이트인 것을 특징으로 하는 방법.
11. 제 1항에 있어서, 단계(c)에서 스크리닝된 숙주세포가 두번째의 돌연변이유발처리,
재스크리닝, 재분리 및/또는 재클로닝을 받게 하는 것을 특징으로 하는 방법.
12. 제 1항 내지 11항중의 어느 한 항에 있어서, 임의적 돌연변이유발이 모 지질분해
효소를 암호화하는 DNA 서열의 부분으로 국소화되는 것을 특징으로 하는 방법.
13. 제1항 내지 12항중의 어느 한 항에 있어서, 모 지질분해효소가 리파제, 에스테라제,
쿠티나제 또는 포스포리파제인 것을 특징으로 하는 방법.
14. 제12항 또는 13항에 있어서, 모 지질분해효소가 리파제이고 국소화된 임의적 돌연

변이유발이 지질 접촉대를 암호화하는 DNA 서열의 부분 또는 모 리파제의 그
부분에서 실행되는 것을 특징으로 하는 방법.

15. 제14항에 있어서, 국소화된 임의적 돌연변이유발이 리드 부위를 암호화하는 DNA
서열 및/또는 모리파제의 소수성의 잘라진 틈의 부분, 또는 상기 리드 부위 및/또는
소수성 결합 잘라진 틈의 부분에서 실행되는 것을 특징으로 하는 방법.

16. 제 1항 내지 13항중의 어느 한 항에 있어서, 모 지질분해효소가 미생물로부터
유도될 수 있는 것을 특징으로 하는 방법.

17. 제18항에 있어서, 모 지질분해효소가 균류에서 유도될 수 있는 것을 특징으로
하는 방법.

18. 제17항에 있어서, 모 지질분해효소를 암호화하는 DNA 서열이 *Humicola* sp.,
Rhizomucor sp., *Rhizopus* sp., *Candida* sp.의 균주로부터 유도될 수 있는 것을
특징으로 하는 방법.

19. 제18항에 있어서, 모 지질분해효소가 리파제이고 모리파제를 암호화하는 DNA
서열이 *H. lanuginosa* 균주, 예를들면, *H. lanuginosa* 균주 DSM 4109, *Rh. mucor*의
균주, 또는 *C. antarctica*의 균주로부터 유도될 수 있는 것을 특징으로 하는 방법.

20. 제19항에 있어서, 임의적 돌연변이를 일으키는 DNA 서열이 DSM 4109로부터
얻을 수 있는 *H. lanuginosa* 리파제의 아미노산 잔기 21-27, 56-64, 81-99, 108-116,
145-147, 174, 202-213, 226-227, 246-259 또는 263-269에 의해 정의된 부위중 적어도
한 곳을 암호화하는 것을 특징으로 하는 방법.

21. 제20항에 있어서, 국소화된 임의적 돌연변이는 상기 부위의 적어도 두 곳에서
실행되는 것을 특징으로 하는 방법.

22. 제16항에 있어서, 모 지질분해효소가 박테리아에서 유도될 수 있는 것을 특징으로
하는 방법.

23. 제22항에 있어서, 모 지질분해효소를 암호화하는 DNA 서열이 *P. cepacia*,
P. alcaligenes, *P. pseudoalcaligenes* 또는 *P. fragi* 같은 *Pseudomonas* spp.의 균주,
 또는 *Bacillus*의 균주에서 유도될 수 있는 것을 특징으로 하는 방법.
24. 제 1항 내지 23항중의 어느 한 항을 따른 방법에 의해 제조된 지질분해효소의
 변이체.
25. 제24항에 있어서, 다음의 위치중 적어도 한 곳에서의 돌연변이로 이루어지는 DSM
 4109로부터 얻을 수 있는 *H. lanuginosa* 리파제 또는 그의 유사체의 변이체인 것을
 특징으로 하는 변이체:
 K46, E56, S58, G61, T64, N73, S83, I90, G91, N92, N94, D96, L97,
 K98, E99, I100, D102, A121, E129, D167, R205, E210, K237, N251,
 I252, D254, P256, G263, L264 또는 T267.
26. 아미노산 잔기 56-64, 83-100 또는 205-211에 의해 정의된 부위중 적어도 한
 곳에서의 돌연변이를 지니는, 균주 DSM 4109로부터 얻을 수 있는 *H. lanuginosa*
 리파제 또는 상기 리파제의 유사체의 변이체.
27. 제26항에 있어서, 다음의 돌연변이중 적어도 하나로 이루어지는 것을 특징으로
 하는 변이체:
 K46R, D57G, S58F, G61S, D62C, T64R, S83T, I90F, G91A, N92H, N94I,
 N94K, L97M, K98I, I100V, D102K, A121V, E129K, D167G, R205K,
 E210W, K237M, N259W, I252L, D254W, P256T, G263A, L264Q 또는 T267W.
28. 다음의 돌연변이중 적어도 하나로 이루어지는 DSM 4109로부터 얻을 수 있는
H. lanuginosa 리파제 또는 그의 유사체의 변이체:
 E87K+D96V
 E87K+G91A+D96A
 N94K+F95L+D96H
 A121V+R205K+E210Q
 F95C+D96N
 G91S+L93V+F95C
 E87K+G91A+D96R+I100V
 E87K+G91A

S83T+E87K+Q249R
 S83T+E87K+W89G+G91A+N94K+D96V
 N73D+S85T+E87K+G91A+N94K+D94A
 E87K+G91A+L93I+N94K+D96A
 D167G+E210V
 N73D+E87K+G91A+N94I+D96G
 S83T+E87K+G91A+N92H+N94K+D96M
 E210W
 E56T+D57L+I90F+D96L+E99K
 E56R+D57L+V60M+D62N+S83T+D96P+D102E
 D57G+N94K+K96L+L97M
 E87K+G91A+D96R+I100V+E129K+K237M+I252L+P256T+G263A+L264Q
 E56R+D57G+S58F+D62C+T64R+E87G+G91A+F95L+D96P+K98I+K237M
 K46R, E56R, G61S
 D102K
 D167G
 N73D+E87K+G91A+N94I+D96G
 E210V
 E210W
 N251W+D254W+T267W
 S83T+E87K+G91A+N92H+N94K+D96M
 E56R+I90F+D96L+E99K
 D57G+N94K+D96L+L97M.

29. 제 1항 내지 23항중의 어느 항에 따르는 방법의 단계(c)에서 스크리닝된 숙주세포로부터 분리되는, 모 지질분해효소와 비교하여 칼슘에 대해 감소된 의존성 및/또는 새제나 새제 성분에 대해 개선된 내성을 갖는 지질분해효소의 변이체를 암호화하는 돌연변이된 DNA 서열로 이루어지는 DNA 구조물.
30. 제24항 내지 28항중의 어느 항에 따르는 *H. lanuginosa* 리파제 변이체를 암호화하는 것을 특징으로 하는 DNA 구조물.
31. 제29항 또는 30항에 따른 DNA 구조물을 분비하는 벡터.
32. 제31항에 있어서, 플라스미드 또는 박테리오파지인 것을 특징으로 하는 벡터.

33. 제31항 또는 32항에 있어서, 모 지질분해효소의 변이체의 발현을 허용하는 DNA 서열을 더 포함하는 발현 벡터인 것을 특징으로 하는 벡터.
34. 제29항 또는 30항에 따르는 DNA 구조물 또는 제31항 내지 33항중의 어느 항을 따른 벡터를 분비하는 숙주세포.
35. 제34항에 있어서, 미생물 세포인 것을 특징으로 하는 세포.
36. 제35항에 있어서, 균류 또는 박테리아 균주의 세포인 것을 특징으로 하는 세포.
37. 제36항에 있어서, *A. niger*, *A. oryzae* 및 *A. nidulans* 같은 *Aspergillus* 속의 세포, 또는 *S. cerevisiae* 같은 *Saccharomyces* 속의 세포인 것을 특징으로 하는 세포.
38. 제36항에 있어서, 그람-양성의 박테리아 균주의 세포, 예를들어, *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus lentus*, *Bacillus brevis*, *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus alkalophilus*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus coagulans*, *Bacillus circulans*, *Bacillus lautus*, *Bacillus thuringiensis* 또는 *Streptomyces lividans* 또는 *Streptomyces murinus* 같은 *Bacillus* 속의 세포, 또는 *E. coli* 같은 그람-음성의 박테리아 균주의 세포인 것을 특징으로 하는 세포.
39. 제 1항 내지 23항중의 어느 항의 방법에 따라 변이체 지질분해효소를 제조하고 단계(c)에서 스크리닝된 숙주세포로부터 지질분해효소 변이체를 회수하는 것으로 이루어지는, 모 지질분해효소와 비교하여 칼슘에 대해 감소된 의존성 및/또는 세제나 세제 성분에 대해 개선된 내성을 갖는 모 지질분해효소의 변이체를 제조하는 방법.
40. 변이체를 발현하기에 적당한 조건하에서 제34항 내지 38항중의 어느 항에 따른 숙주세포를 배양하고 배양물로부터 발현된 변이체를 회수하는 것으로 이루어지는 모 지질분해효소와 비교하여 칼슘에 대해 감소된 의존성 및/또는 세제나 세제 성분에 대해 개선된 내성을 갖는 모 지질분해효소의 변이체를 제조하는 방법.
41. 제39항 또는 40항에 따른 방법에 의해 제조된 지질분해효소의 변이체.

42. 임의로 비-분진성 과립, 안정화된 액체 또는 보호된 효소의 형태로, 제24항 내지 28항 또는 41항중의 어느 항에 따른 지질분해효소의 변이체로 이루어지는 세제 첨가제.
43. 제42항에 있어서, 첨가제 g당 효소 단백질 0.02-200mg을 함유하는 것을 특징으로 하는 세제 첨가제.
44. 제42항 또는 43항에 있어서, 프로테아제, 아밀라제, 펙옥시다제, 쿠티나제, 리파제 및/또는 셀룰라제 같은 또다른 효소를 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는 세제 첨가제.
45. 제24항 내지 28항중의 어느 한 항 또는 41항중에 따른 지질분해효소의 변이체로 이루어지는 세제 조성물.
46. 제45항에 있어서, 추가로 프로테아제, 아밀라제, 펙옥시다제, 쿠티나제, 리파제 및/또는 셀룰라제 같은 또다른 효소를 포함하는 것을 특징으로 하는 세제 조성물.

요 약 서

모 지질분해효소를 제조하는 방법은, (a) 모 지질분해효소를 암호화하는 DNA 서열을 임의적 돌연변이유발을 일으키게 하고, (b) 숙주세포에서 단계(a)에서 얻은 돌연변이된 DNA 서열을 발현시키고, 및 (c) 모 지질분해효소와 비교하여 칼슘에 대해 감소된 의존성 및/또는 세제나 세제 성분에 대해 개선된 내성을 갖는 돌연변이된 지질분해 효소를 발현하는 숙주세포를 스크리닝하는 것으로 이루어진다.

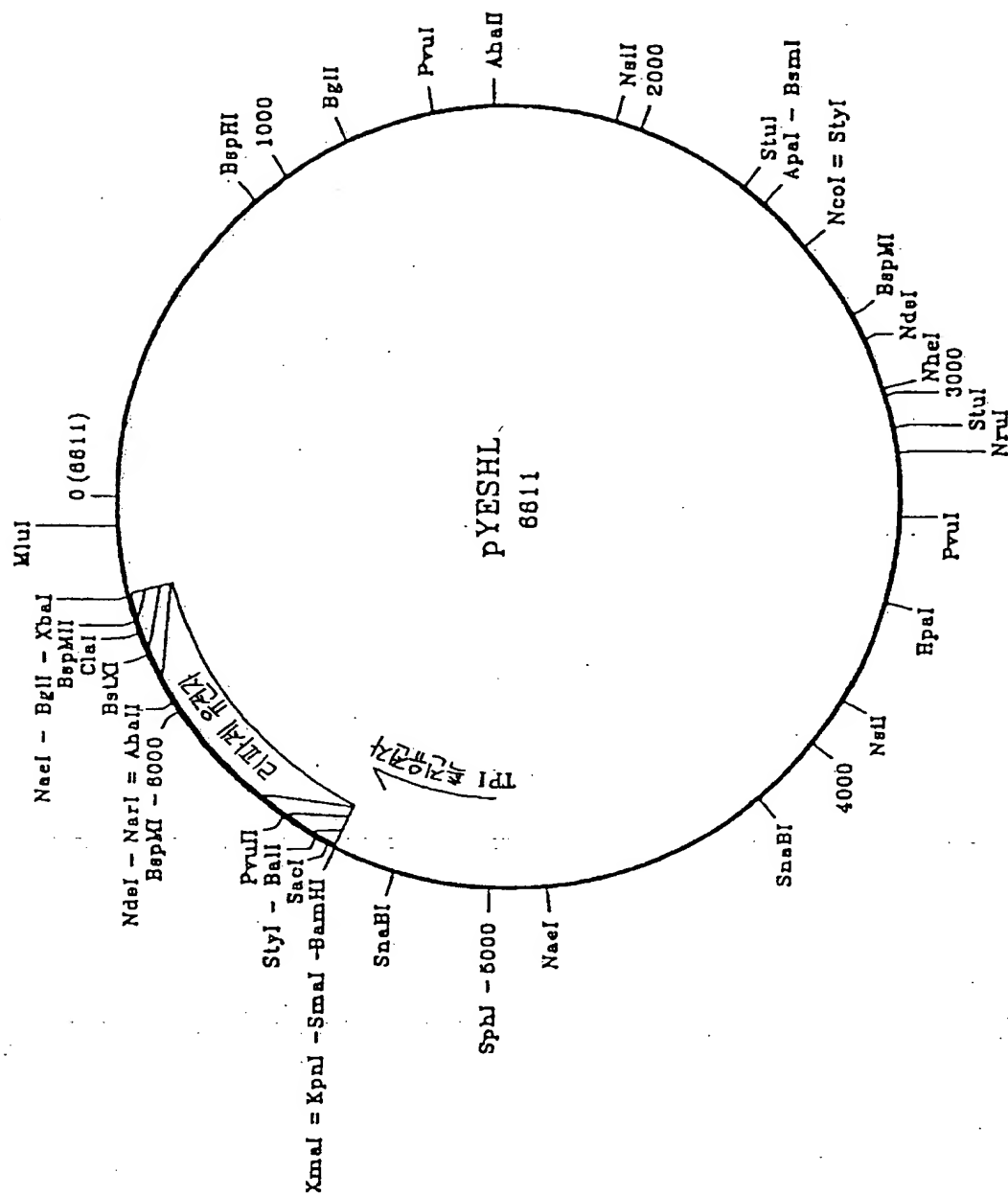


Fig. 1

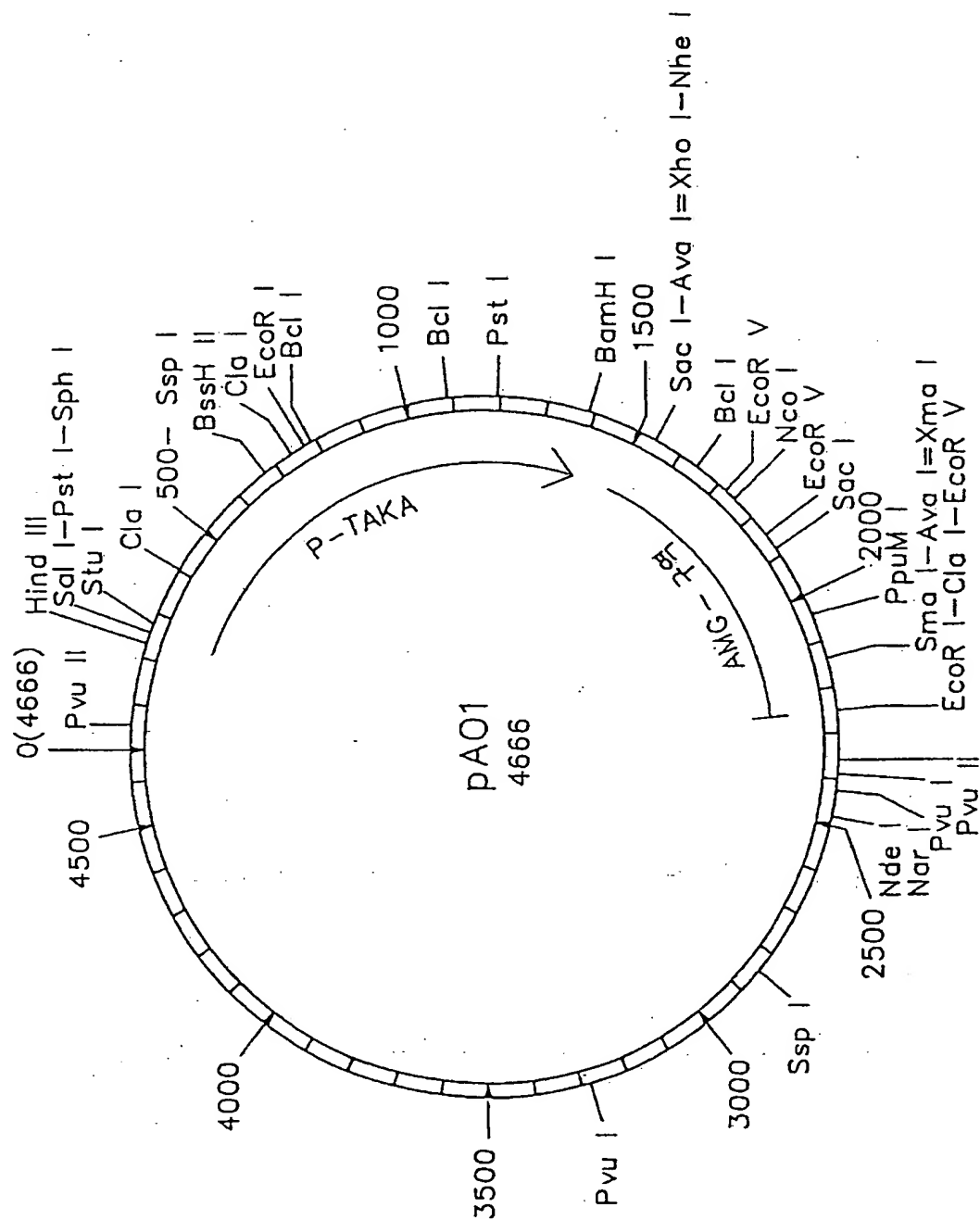


Fig. 2

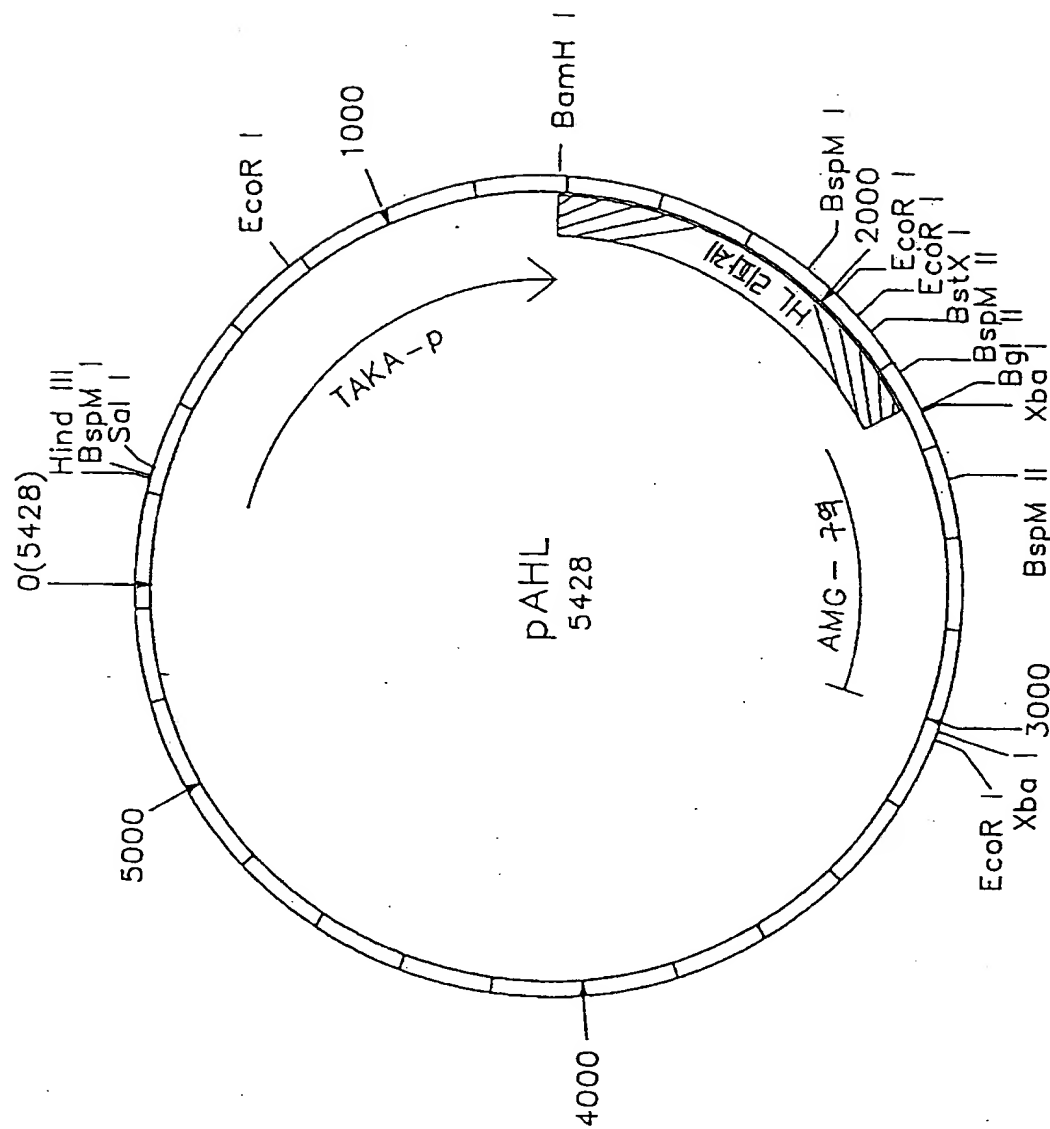


Fig. 3

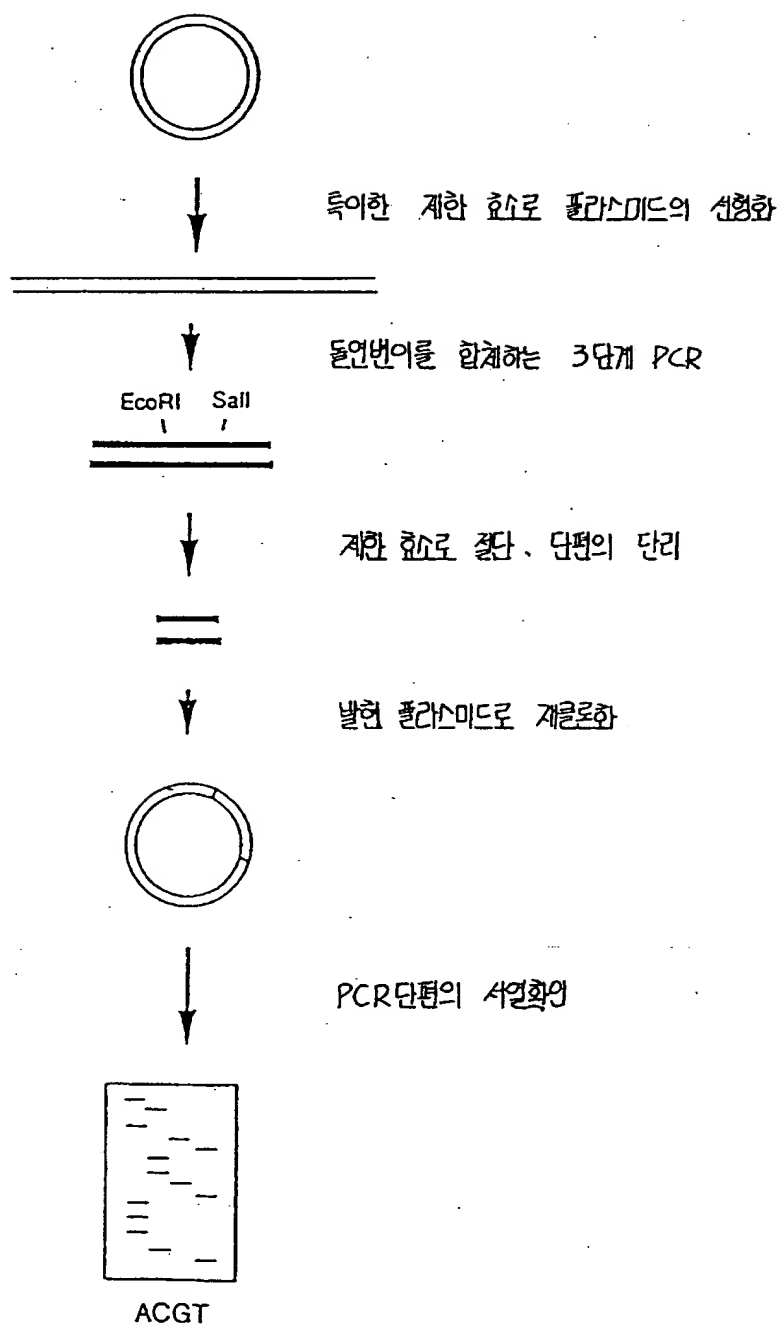


Fig. 4

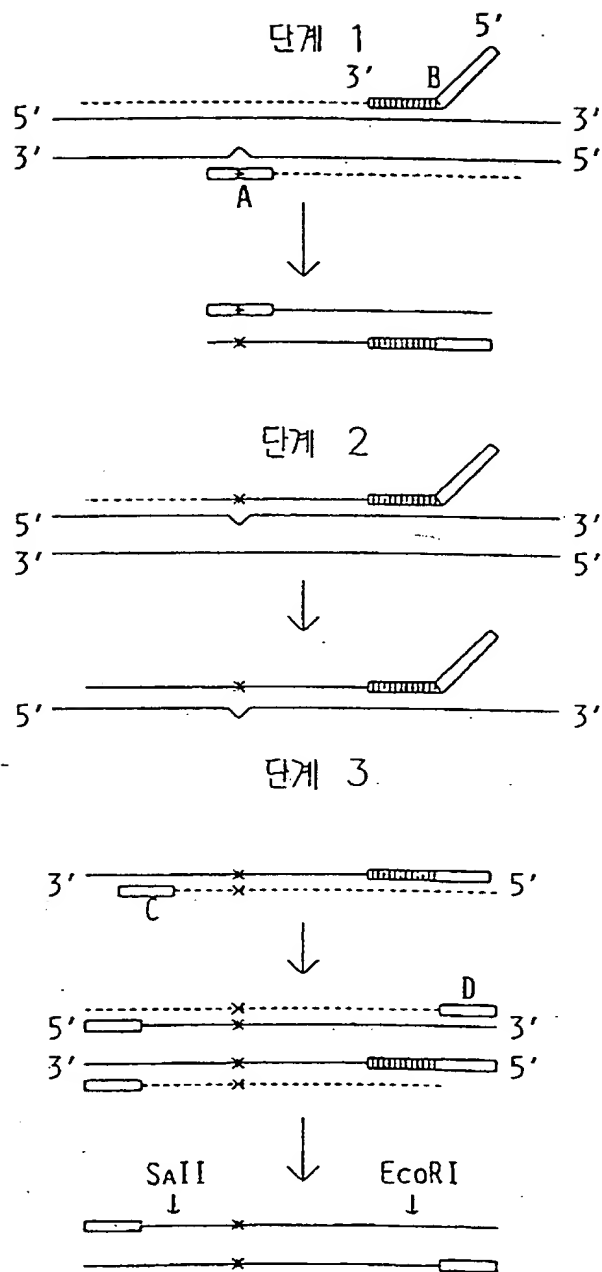


Fig. 5

AMENDMENT

(Under Art. 205(1) of the Law)

Filed by	Name	Novo Nordisk A/S					
	Relation to the case	Applicant	Nationality	Denmark			
	Address	Novo Allé DK-2880 Bagsværd, Denmark					
Attorney	Y. S. Chang & J. S. Jeong						
International Application Number	PCT/DK95/00079						
International Application Date	February 22, 1995						
Title of Invention	A Method of Preparing a Variant of a Lipolytic Enzyme						
International Filing Date of Amendment	- April 19, 1996						
<p>We are filing this Amendment pursuant to Article 115 of the Enforcement Regulation of the Korean Patent Law.</p> <p style="text-align: right;">Date : August 22, 1996</p> <p style="text-align: right;">Y. S. Chang Patent Attorney J. S. Jeong Patent Attorney</p> <p>To : Commissioner Korean Industrial Property Office</p>							
Attached Document	1. Translation of Amendment Original, Duplicate Each 1 copy						

보정된 특허청구의 범위

1. (a) 모 지질분해효소를 암호화하는 DNA 서열을 임의적 돌연변이유발을 일으키게 하고,
(b) 숙주세포에서 단계 (a)에서 얻은 돌연변이된 DNA 서열을 발현시키고, 및
(c) 칼슘에 대해 감소된 의존성을 갖는 돌연변이된 지질분해효소를 발현하는 숙주 세포를 스크리닝하는 것으로 이루어진 모 지질분해효소의 변이체를 제조하는 방법.
2. 제 1항에 있어서, 단계(c)에서 모 지질분해효소와 비교하여 세제나 세제 성분에 대해 개선된 내성에 대한 스크리닝을 더 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.
3. 제 1항 또는 2항에 있어서, 임의적 돌연변이유발은 물리적 또는 화학적 돌연변이 유발제의 사용, 올리고뉴클레오타이드의 사용 또는 PCR 발생 돌연변이유발제의 사용에 의해 실행되는 것을 특징으로 하는 방법.
4. 제 3항에 있어서, 돌연변이유발제는 포름산, UV 조사, 히드록실아민, N-메틸-N'-니트로-N-니트로소구아니딘(MNNG), O-메틸히드록실아민, 아질산, 에틸메탄술포네이트(EMS), 중아황산나트륨, 및 뉴클레오타이드 유사체로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 방법.
5. 제 1항에 있어서, 돌연변이된 DNA 서열의 발현은 돌연변이된 DNA 서열의 발현을 허용하는 기능을 암호화하는 DNA 서열을 임의로 더 포함하는 돌연변이된 DNA 서열을 갖는 적당한 숙주세포를 형질전환하고 돌연변이된 DNA 서열을 발현하기 위해 적당한 조건하에서 단계(b)에서 얻은 숙주세포를 배양함으로써 실행되는 것을 특징으로 하는 방법.
6. 제 1항에 있어서, 돌연변이된 DNA 서열을 발현하는데 사용된 숙주세포가 미생물

세포인 것을 특징으로 하는 방법.

7. 제 6항에 있어서, 숙주세포가 균류 또는 박테리아 균주의 세포인 것을 특징으로 하는 방법.

8. 제 7항에 있어서, 숙주세포가 *A. niger*, *A. oryzae* 및 *A. nidulans* 같은 *Aspergillus* 속의 세포, 또는 *S. cerevisiae* 같은 *Saccharomyces* 속의 세포인 것을 특징으로 하는 방법.

9. 제 7항에 있어서, 숙주세포가 그람-양성의 박테리아의 균주의 세포, 예를들어, *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus lentus*, *Bacillus brevis*, *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus alkalophilus*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus coagulans*, *Bacillus circulans*, *Bacillus lautus*, *Bacillus thuringiensis* 또는 *Streptomyces lividans* 또는 *Streptomyces murinus* 같은 *Bacillus* 속의 세포, *E. coli* 같은 그람-음성의 박테리아 균주의 세포인 것을 특징으로 하는 방법.

10. 제 2항에 있어서, 돌연변이된 지질분해효소는 비이온성, 음이온성, 양이온성, 양성 이온성 또는 양쪽성의 계면활성제에 대한 개선된 내성을 갖는 것을 특징으로 하는 방법.

11. 제10항에 있어서, 비이온성 계면활성제는 알코올 에톡실레이트 및/또는 음이온성 계면활성제는 LAS 또는 알킬술페이트인 것을 특징으로 하는 방법.

12. 제 1항에 있어서, 단계(c)에서 스크리닝된 숙주세포가 두번째의 돌연변이유발처리, 재스크리닝, 재분리 및/또는 재클로닝을 받게 하는 것을 특징으로 하는 방법.

13. 제 1항 내지 12항중의 어느 한 항에 있어서, 임의적 돌연변이유발이 모 지질분해 효소를 암호화하는 DNA 서열의 부분으로 국소화되는 것을 특징으로 하는 방법.

14. 제1항 내지 13항중의 어느 한 항에 있어서, 모 지질분해효소가 리파제, 에스테라제, 쿠티나제 또는 포스포리파제인 것을 특징으로 하는 방법.

15. 제13항 또는 14항에 있어서, 모 지질분해효소가 리파제이고 국소화된 임의적 돌연변이유발이 지질 접촉대를 암호화하는 DNA 서열의 부분 또는 모 리파제의 그 부분에서 실행되는 것을 특징으로 하는 방법.
16. 제15항에 있어서, 국소화된 임의적 돌연변이유발이 리드 부위를 암호화하는 DNA 서열 및/또는 모리파제의 소수성의 갈라진 틈의 부분, 또는 상기 리드 부위 및/또는 소수성 결합 갈라진 틈의 부분에서 실행되는 것을 특징으로 하는 방법.
17. 제 1항 내지 16항중의 어느 한 항에 있어서, 모 지질분해효소가 미생물로부터 유도될 수 있는 것을 특징으로 하는 방법.
18. 제17항에 있어서, 모 지질분해효소가 균류에서 유도될 수 있는 것을 특징으로 하는 방법.
19. 제18항에 있어서, 모 지질분해효소를 암호화하는 DNA 서열이 *Humicola* sp., *Rhizomucor* sp., *Rhizopus* sp., *Candida* sp.의 균주로부터 유도될 수 있는 것을 특징으로 하는 방법.
20. 제19항에 있어서, 모 지질분해효소가 리파제이고 모리파제를 암호화하는 DNA 서열이 *H. lanuginosa* 균주, 예를들면, *H. lanuginosa* 균주 DSM 4109, *Rh. mucor*의 균주, 또는 *C. antarctica*의 균주로부터 유도될 수 있는 것을 특징으로 하는 방법.
21. 제20항에 있어서, 임의적 돌연변이를 일으키는 DNA 서열이 DSM 4109로부터 얻을 수 있는 *H. lanuginosa* 리파제의 아미노산 잔기 21-27, 56-64, 81-99, 108-116, 145-147, 174, 202-213, 226-227, 246-259 또는 263-269에 의해 정의된 부위중 적어도 한 곳을 암호화하는 것을 특징으로 하는 방법.
22. 제21항에 있어서, 국소화된 임의적 돌연변이는 상기 부위의 적어도 두 곳에서 실행되는 것을 특징으로 하는 방법.
23. 제17항에 있어서, 모 지질분해효소가 박테리아에서 유도될 수 있는 것을 특징으로

하는 방법.

24. 제23항에 있어서, 모 지질분해효소를 암호화한 DNA 서열이 *P. cepacia*,

P. alcaligenes, *P. pseudoalcaligenes* 또는 *P. fragi* 같은 *Pseudomonas* spp.의 균주,

또는 *Bacillus*의 균주에서 유도될 수 있는 것을 특징으로 하는 방법.

25. 다음의 위치중 적어도 한 곳에서의 돌연변이로 이루어지는 DSM 4109로부터

얻을 수 있는 *H. lanuginosa* 리파제 또는 그의 유사체의 변이체인 것을 특징으로 하는

변이체:

K46, E56, S58, G61, T64, N73, S83, I90, G91, N92, N94, D96,
L97, K98, E99, I100, D102, A121, E129, D167, R205, E210, K237,
N251, I252, D254, P256, G263, L264 또는 T267.

26. 아미노산 잔기 56-64, 83-100 또는 205-211에 의해 정의된 부위중 적어도 한

곳에서의 돌연변이를 지니는, 균주 DSM 4109로부터 얻을 수 있는 *H. lanuginosa*

리파제 또는 상기 리파제의 유사체의 변이체.

27. 제26항에 있어서, 다음의 돌연변이중 적어도 하나로 이루어지는 것을 특징으로

하는 변이체:

K46R, D57G, S58F, G61S, D62C, T64R, S83T, I90F, G91A, N92H,
N94I, N94K, L97M, K98I, I100V, D102K, A121V, E129K, D167G,
R205K, E210W, K237M, N259W, I252L, D254W, P256T, G263A, L264Q
또는 T267W.

28. 다음의 돌연변이중 적어도 하나로 이루어지는 DSM 4109로부터 얻을 수 있는

H. lanuginosa 리파제 또는 그의 유사체의 변이체:

S83T+N94K+D96N

E87K+D96V

E87K+G91A+D96A

N94K+F95L+D96H

A121V+R205K+E210Q

F95C+D96N

G91S+L93V+F95C

E87K+G91A+D96R+I100V
 E87K+G91A
 S83T+E87K+Q249R
 S83T+E87K+W89G+G91A+N94K+D96V
 N73D+S85T+E87K+G91A+N94K+D94A
 E87K+G91A+L93I+N94K+D96A
 D167G+E210V
 N73D+E87K+G91A+N94I+D96G
 S83T+E87K+G91A+N92H+N94K+D96M
 E210W
 E56T+D57L+I90F+D96L+E99K
 E56R+D57L+V60M+D62N+S83T+D96P+D102E
 D57G+N94K+K96L+L97M
 E87K+G91A+D96R+I100V+E129K+K237M+I252L+P256T+G263A+L264Q
 E56R+D57G+S58F+D62C+T64R+E87G+G91A+F95L+D96P+K98I+K237M
 K46R, E56R, G61S
 D102K
 D167G
 N73D+E87K+G91A+N94I+D96G
 E210V
 E210W
 N251W+D254W+T267W
 S83T+E87K+G91A+N92H+N94K+D96M
 E56R+I90F+D96L+E99K
 D57G+N94K+D96L+L97M.

29. 제 1항 내지 23항중의 어느 항에 따르는 방법의 단계(c)에서 스크리닝된 숙주세포로부터 분리되는, 모 지질분해효소와 비교하여 칼슘에 대해 감소된 의존성 및/또는 세제나 세제 성분에 대해 개선된 내성을 갖는 A의 변이체를 암호화하는 돌연변이된 DNA 서열로 이루어지는 DNA 구조물.
30. 제24항 내지 28항중의 어느 항에 따르는 *H. lanuginosa* 리파제 변이체를 암호화하는 것을 특징으로 하는 DNA 구조물.
31. 제29항 또는 30항에 따른 DNA 구조물을 은닉하는 벡터.
32. 제31항에 있어서, 플라스미드 또는 박테리오파지인 것을 특징으로 하는 벡터.

33. 제31항 또는 32항에 있어서, 모 지질분해효소의 변이체의 발현을 허용하는 DNA 서열을 더 포함하는 발현 벡터인 것을 특징으로 하는 벡터.
34. 제29항 또는 30항에 따르는 DNA 구조물 또는 제31항 내지 33항중의 어느 항을 따른 벡터를 은닉하는 숙주세포.
35. 제34항에 있어서, 미생물 세포인 것을 특징으로 하는 세포.
36. 제35항에 있어서, 균류 또는 박테리아 균주의 세포인 것을 특징으로 하는 세포.
37. 제36항에 있어서, *A. niger*, *A. oryzae* 및 *A. nidulans* 같은 *Aspergillus* 속의 세포, 또는 *S. cerevisiae* 같은 *Saccharomyces* 속의 세포인 것을 특징으로 하는 세포.
38. 제36항에 있어서, 그람-양성의 박테리아 균주의 세포, 예를들어,
Bacillus subtilis, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus lentus*,
Bacillus brevis, *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus alkalophilus*,
Bacillus amyloliquefaciens, *Bacillus coagulans*, *Bacillus circulans*,
Bacillus lautus, *Bacillus thuringiensis* 또는 *Streptomyces lividans* 또는 *Streptomyces murinus*
같은 *Bacillus* 속의 세포, 또는 *E. coli* 같은 그람-음성의 박테리아 균주의 세포인
것을 특징으로 하는 세포.
39. 제 1항 내지 23항중의 어느 항의 방법에 따라 변이체 지질분해효소를 제조하고
단계(c)에서 스크리닝된 숙주세포로부터 지질분해효소 변이체를 회수하는 것으로
이루어지는, 모 지질분해효소와 비교하여 칼슘에 대해 감소된 의존성 및/또는 세제나
세제 성분에 대해 개선된 내성을 갖는 모 지질분해효소의 변이체를 제조하는 방법.
40. 변이체를 발현하기에 적당한 조건하에서 제34항 내지 38항중의 어느 항에 따른
숙주세포를 배양하고 배양물로부터 발현된 변이체를 회수하는 것으로 이루어지는
모 지질분해효소와 비교하여 칼슘에 대해 감소된 의존성 및/또는 세제나 세제 성분에
대해 개선된 내성을 갖는 모 지질분해효소의 변이체를 제조하는 방법.
41. 임의로 비-분진성 과립, 안정화된 액체 또는 보호된 효소의 형태로, 제24항 내지

28항 또는 41항중의 어느 항에 따른 지질분해효소의 변이체로 이루어지는 세제 첨가제.

42. 제41항에 있어서, 첨가제 g당 효소 단백질 0.02-200mg을 함유하는 것을 특징으로 하는 세제 첨가제.

43. 제41항 또는 42항에 있어서, 프로테아제, 아밀라제, 펌옥시다제, 쿠티나제, 리파제 및/또는 셀룰라제 같은 또다른 효소를 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는 세제 첨가제.

44. 제24항 내지 28항중의 어느 한 항에 따른 지질분해효소의 변이체로 이루어지는 세제 조성물.

45. 제44항에 있어서, 추가로 프로테아제, 아밀라제, 펌옥시다제, 쿠티나제, 리파제 및/또는 셀룰라제 같은 또다른 효소를 포함하는 것을 특징으로 하는 세제 조성물.

AMENDMENT

Filed by	Name	Novo Nordisk A/S					
	Relation to the case	Applicant	Nationality	Denmark			
	Address	Novo Allé DK-2880 Bagsværd, Denmark					
Attorney	Y. S. Chang						
Description of the case	Korean Patent Application No. 96-704602						
Title of Invention	A Method of Preparing a Variant of a Lipolytic Enzyme						
Date notified	August 23, 1996						
Deadline	October 23, 1996						
Object to be amended	The executed Power of Attorney						
Contents of Amendment	-As per attached sheets						
<p style="text-align: center;">We are filing this Amendment pursuant to Article 13 of the Enforcement Regulation of the Korean Patent Law.</p> <p style="text-align: right;">Date : Sept. 3, 1996</p> <p style="text-align: right;">Y. S. Chang Patent Attorney</p> <p>To : Commissioner Korean Industrial Property Office</p>							
Attached Document	1. The executed Power of Attorney with its Translation Each 1 copy						

TRANSLATION

Official Filing Charges	
Amendment	₩ 8,000
Additional Request for Examination	
Others	
Total	₩ 8,000

접수인			방심 심사관	담당	심사관	
보정서						
제출인	성명	노보 노르디스크 아크타에 셀스카브 대표자 안네 제케르			사건과 의관계	출원인
	주소	덴마크 디케이-2880 박스베르트 노보 알레			국적	덴마크
대리인	성명	변리사 장용식, 정진상		대리인코드	K020, K184	
	주소	서울특별시 강남구 역삼동 824-20 (전화번호 : 556-8224~6)				
출원번호	1996년 특허출원 제704602호					
출원일자	1996년 8월 22일					
발명의 명칭	지질분해효소의 변이체 제조방법					
제출원인	<input type="checkbox"/> 자진 <input checked="" type="checkbox"/> 통지(또는명령): 통지를 받은 날짜(1996. 8. 23.) 제출마감일(1996. 10. 23.)					
보정할 사항	서면(대표자성명 기재) 및 위임장					
보정내용 및 이유	별지사용					
심사 청구 사항	<input checked="" type="checkbox"/> 심사미청구 <input type="checkbox"/> 심사청구 : 청구일자 ()					
보정에 의한 청구항수 및 청구료의 증가	산출대상 구분	최초출원 ()	보정서 ()		보정서 ()	
	최종항번호					
	보정항수		삭제항	신설항	삭제항	신설항
청구항수						
특허법 시행규칙 제13조·실용신안법 시행규칙 제12조의 규정에 의하여 위와 같이 제출합니다. <div style="text-align: center;">1996년 9월 3일</div> <div style="text-align: center;">대리인 변리사 장용식</div> 특허청장 귀하						
※ 첨부서류 1. 서면 각3통 2. 위임장 및 동변역문 각1통			수 수 료			
			보정료	8,000원		
			심사청구료			
			기타수수료			
			합 계	8,000원		

張龍植特許法律事務所

TEL 556-8224~6

NZAS-0018758

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☒ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.